

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО ”
Факультет електроніки
Кафедра електронної інженерії

"На правах рукопису"

УДК 612.172.4

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ В.І. Тимофєєв

“ _____ ” 20__ р.

Магістерська дисертація

зі спеціальності 153 мікро- та наносистемна техніка

на тему: «Розпізнавання стадій розвитку кардіоміоцитів методами машинного навчання»

Виконав: студент 2 курсу, групи ДМ-91мп

Задоха Богдан Геннадійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Науковий керівник доц. каф. ЕІ, доц., к.т.н. Іванушкіна Н. Г.

(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент доц. каф. МЕ, доц., к.т.н. Волхова Т. Л.

(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент _____ (підпис)

Київ - 2020 року

**Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”**

Факультет електроніки
Кафедра електронної інженерії
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)
за освітньо-професійною програмою
Спеціальність 153 мікро- та наносистемна техніка

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ В. І. Тимофєєв
“ ____ ” _____ 20__ р.

**З А В Д А Н Н Я
НА МАГІСТЕРСЬКУ ДИСЕРТАЦІЮ СТУДЕНТУ
Задоха Богдану Геннадійовичу**

1. Тема дисертації: «Розпізнавання стадій розвитку кардіоміоцитів методами машинного навчання»

Науковий керівник: доц. каф. ЕІ, доц., к.т.н. Іванушкіна Н. Г.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом по університету від “05” листопада 2020 року № 3241-с

2. Строк подання студентом роботи: 08 грудня 2020 року
3. Об'єкт дослідження: стадії розвитку кардіоміоцитів
4. Вихідні дані: база даних із зображеннями стадій розвитку кардіоміоцитів.
5. Перелік питань, які потрібно розробити: 1. Основи будови та функціонування кардіоміоцитів. 2. Багатофотонна мікроскопія. 3. Аналіз медичних зображень. 4. Розробка методу аналізу стадій розвитку кардіоміоцитів. 5. Розробка стартап-проекту.
6. Перелік графічного (ілюстративного) матеріалу: потенціал дії кардіоміоциту, зображення клітин з конфокального мікроскопу, зображення архітектури нейронних мереж, результати тренування алгоритму штучного інтелекту.
7. **Орієнтовний перелік публікацій:** 1. Методи виявлення потенціалів дії кардіоміоцитів з зашумлених сигналів/ Задоха Б. Г., Іванушкіна Н.Г. // XVIII Міжнародна науково-технічна конференція «Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів»: матеріали конференції. – Кременчук: КрНУ, 2019. – 76-77 с.
2. Preliminary Statistical Analysis of Large Conductance Cationic Channels Flickering/ A. Kotliarova, O. Kotyk, N. Ivanushkina, K. Ivanko, V.Lukianenko, B. Zadokha, I.

Nesteruk // Proceeding of 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)/ – 2020/. – pp.609-612

3.New Approach for Currents Assessment in Single Ion Channels of Cardiac Cells Nuclei/ N. Ivanushkina, K. Ivanko, A. Kotliarova, O. Kotyk, V. Lukianenko, I. Nesteruk, V. Timofeyev, B. Zadokha // Proceeding of 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)/ – 2020/. – pp.589-602

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

9. Дата видачі завдання:

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вивчення та підбір наукових матеріалів з теми дипломної роботи	20.10.2020	
2	Написання пояснювальної записки	01.11.2020	
3	Виконання практичної частини роботи	10.11.2020	
4	Аналіз отриманих результатів практичної частини	25.11.2020	
5	Оформлення дипломної роботи	01.12.2020	
6	Проходження перевірки нормоконтролю	08.12.2020	

Студент

(підпис)

Задоха Б. Г.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Іванушкіна Н. Г.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 88 с., 5 ч., 22 табл., 26 рис., 15 джерел.

КАРДІОМІОЦИТИ, КОНФОКАЛЬНИЙ МІКРОСКОП, НЕЙРОННІ МЕРЕЖІ, ОБРОБКА ЗОБРАЖЕНЬ

Об'єктом розгляду роботи є стадії розвитку серцевих клітин. Предмет роботи – аналіз зображень кардіоміоцитів, отриманих за допомогою конфокального мікроскопу.

Метою роботи є класифікація зображень кардіоміоцитів за допомогою алгоритмів машинного навчання, а саме – за допомогою згорткових нейронних мереж.

Перший розділ описує будову кардіоміоцитів, їх електричні особливості та властивості.

Другий розділ містить інформацію про скануючі мікроскопи. Описано методи, які лежать в основі роботи даних мікроскопів. Зроблено акцент на будові конфокального мікроскопу, описано переваги та недоліки відповідного типу мікроскопії.

У третьому розділі наведено інформацію про застосування комп'ютерної обробки для медичних зображень. Також наведено методи обробки зображень, що включають до себе методи машинного навчання. Описано принципи побудови нейронних мереж, приведено відповідні формули. Розглянуто недоліки згорткових нейронних мереж та застосування для обробки медичних зображень.

Четвертий розділ складається з опису розробки алгоритму машинного навчання, який складається з двох частин: попередньої обробки зображень та згорткової нейронної мережі для класифікації зображень.

П'ятий розділ включає розроблення стартап-проекту на основі спроектованого алгоритму.

ABSTRACT

Explanatory note: 88 p., 5 p., 22 tables., 26 figures, 15 references.

CARDIOMYOCYTES, CONFOCAL MICROSCOPE, NEURAL NETWORKS, IMAGE PROCESSING

The object of consideration of the work is the stages of development of heart cells. The subject of the work is the analysis of images of cardiomyocytes obtained using a confocal microscope.

The purpose of the work is to classify images of cardiomyocytes using machine learning algorithms, namely, using convolutional neural networks.

The first section describes the structure of cardiomyocytes, their electrical features, and their properties.

The second section contains information about scanning microscopes. The methods that underlie the operation of these microscopes are described. Emphasis is placed on the structure of the confocal microscope, and the advantages and disadvantages of the corresponding type of microscopy are described.

The third section provides information on the application of computer processing for medical images. Image processing methods that include machine learning methods are also listed. The principles of constructing neural networks are described, and the corresponding formulas are given. The disadvantages of convolutional neural networks and applications for medical image processing are considered.

The fourth section describes the development of a machine learning algorithm, which consists of two parts: image preprocessing and a convolutional neural network for image classification.

The fifth section includes the development of a startup project based on the designed algorithm.

ЗМІСТ

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАКИ	8
ВСТУП.....	9
1 ОСНОВИ БУДОВИ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ КАРДІОМІОЦИТІВ.....	10
1.1 Визначення та особливості.....	10
1.2 Будова кардіоміоцитів	11
1.3 Потенціал спокою	14
1.4 Потенціал дії.....	16
1.4 Висновки до розділу 1	18
2 БАГАТОФОТОННА МІКРОСКОПІЯ	19
2.1 Використання багатофотонної мікроскопії у нейронауці	20
2.2 Переваги двофотонного збудження	23
2.3 Вплив флуоресцентного випромінювання на живі тканини	25
2.4 Лазери для багатофотонної мікроскопії	26
2.5 Застосування барвників для виявлення мембранних потенціалів клітин	27
2.6 Маркування клітин за допомогою барвників	29
2.7 Конфокальний мікроскоп	30
2.7.1 Особливості конструкції конфокального мікроскопу	32
2.7.2 Переваги та недоліки конфокального мікроскопу	36
2.7.3 Застосування конфокального мікроскопу у вимірюванні мембранного потенціалу	37
2.7.4 Шуми в конфокальному мікроскопі	40
2.8 Висновки до розділу 2	41
3 АНАЛІЗ МЕДИЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ.....	42
3.1 Комп'ютерна діагностика для аналізу медичних зображень	44
3.2 Проблеми під час локалізації та сегментації об'єктів.....	46
3.3 Методи обробки зображень.....	47
3.3.1 Крива Без'є.....	47
3.3.2. Гамма-корекція	48
3.3.3 Розгортка зображення.....	49
3.4 Нейронні мережі для обробки зображень.....	49

3.4.1 Персептрон.....	50
3.4.2 Згорткові нейронні мережі.....	52
3.4.2.1 Згортка та об'єднуючі шари.....	52
3.4.2.2 Застосування повністю згорткових мереж у медицині	54
3.4.3 Розрахунок градієнту у нейронних мережах.....	54
3.4.4 Моделі глибокого навчання	56
3.4.4.1 Проблема «зникаючого градієнту»	56
3.4.4.2 Автоенкодер.....	58
3.5 Висновки до розділу 3	59
4 РОЗРОБКА МЕТОДУ АНАЛІЗУ СТАДІЙ РОЗВИТКУ КАРДІОМІОЦИТІВ	60
4.1 Попередня обробка зображень.....	60
4.2 Розроблення згорткової нейронної мережі.....	67
4.3 Висновки до розділу 4	71
5 РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ	72
5.1 Опис ідеї проекту.....	72
5.2 Технологічний аудит проекту	74
5.3 Аналіз ринкових можливостей запуску стартап-проекту.....	75
5.4 Розробка ринкової стратегії проекту	80
5.5 Розробка маркетингової програми проекту.....	82
5.6 Висновки до розділу 5	85
ВИСНОВКИ	86
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	87

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАКИ

ЗНМ – згорткова нейронна мережа

ПЗМ – повністю згорткова нейронна мережа

ВСТУП

У зв'язку зі збільшенням кількості різноманітних біологічних експериментів важливу роль відіграють комп'ютерні методи обробки результатів дослідів. Одним із сучасних методів досліджень є скануюча мікроскопія. Даний метод дозволяє досліджувати функціонування як окремих клітин організму, так і цілі частини систем організмів. Задля правильного аналізу та оцінки отриманих результатів використовують спеціально розроблене програмне забезпечення.

Машинне навчання є, відносно новим методом, який використовується у аналізі зображень. Варіативність алгоритмів машинного навчання дозволяє покращити ефективність аналізу даних. Однією з областей машинного навчання є навчання з використанням згорткових нейронних мереж. Дане сімейство алгоритмів широко використовується для вирішення проблеми класифікації зображень.

У магістерській дисертації буде виконано проектування алгоритму машинного навчання для класифікації зображень серцевих клітин з використанням розробленої згорткової нейронної мережі. Будуть наведені результати попередньої обробки зображень, архітектура згорткової нейронної мережі та отримані результати класифікації.

1 ОСНОВИ БУДОВИ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ КАРДІОМІОЦИТІВ

1.1 Визначення та особливості

Кардіоміоцити – це клітини серцевого м'язу, з яких складаються передсердя та шлуночки (міокард). Серцевий м'яз відрізняється від скелетного м'язу синхронністю скорочень та розслаблень всього міокарду. Цю синхронність забезпечують нексуси. Нексус – це спеціальний контакт між клітинами м'язу. Він являє собою область мембрани двох кардіоміоцитів, в межі якої мембрани кардіоміоцитів зливаються між собою і такий контакт набуває низького електричного опору, що, власне, і надає можливість швидко розповсюджувати потенціал дії у всьому міокарді [1]. Такі об'єднання кардіоміоцитів за допомогою нексусів називають синцитієм.

Серце поділяється на два синцитії: передсердний та шлуночковий. Передсердний синцитій – це м'язова стінка обох передсердь, а шлуночковий – м'язова стінка обох шлуночків. Ці синцитії розділені один від одного фіброзною перегородкою. Вона не дозволяє переходити збудженню безпосередньо від передсердь до шлуночка, а контролює цей процес за допомогою спеціального атріовентрикулярного пучка. Такий механізм дозволяє передсердям скорочуватись швидше ніж шлуночкам, що, в свою чергу, забезпечує насосну функцію серця [2].

Здатність до скорочень міокарду є можливою завдяки його певним особливостям: автоматизм, провідність, збудливість. Автоматизм – генерація імпульсів клітинами без зовнішніх подразників. Провідність – можливість електротонічної передачі збуджень по провідній системі. Збудливість – здатність кардіоміоцитів збуджуватись під дією імпульсів, які надходять до них по волокнам Пуркін'є. Також важливою особливістю є тривалий період рефрактерності. Функція провідності серця забезпечується низьким електричним опором нексусів. Збудження міокарду починається у синоатріальному вузлі, який ще називають водієм ритму [1].

Функції провідної системи серця: генерація імпульсів з певною частотою, які викликають ритмічні скорочення серцевого м'язу, проведення імпульсів по серцю. Завдяки провідній системі передсердя та шлуночки скорочуються поступово, що дозволяє шлуночкам наповнитись кров'ю до початку систоли. До провідної системи серця належать: сіноатріальний вузол (генерація ритмічних скорочень), атріовентрикулярний вузол (затримка проведення імпульсів між передсерддями та шлуночками), міжвузлові пучки (проведення імпульсів між сіноатріальним та атріовентрикулярним вузлами), права та ліва ніжки пучка Гіса (розповсюдження імпульсів до міокарду) [2].

Кардіоміоцити мають схожу будову із скелетними м'язовими клітинами, проте є і відмінності. Взаємне розташування філаментів актину та міозину у саркомерах надає поперечну посмугованість кардіоміоцитам. Міоцити, які розташовуються поруч відділені один від одного вставними дисками. Диски є місцем проведення потенціалу дії. Кардіоміоцит складається з одного ядра, т-системи сакромери, яка є вдвічі більшою ніж у скелетному м'язовому волокні та т-трубочки. Саркоплазматичний ретикулум контактує з сарколемою та т-системою. Він являє собою замкнуту систему трубочок, які розходяться у межах одного кардіоміоцита та утримують іони кальцію [1].

1.2 Будова кардіоміоцитів

Кардіоміоцити, які знаходяться у шлуночках мають довжину 100-150 мкм та діаметр 10-20 мкм, в той час як кардіоміоцити, що знаходяться у передсерддях мають довжину 40-70 мкм та ширину 5-6 мкм.

Саркоплазма кардіоміоцитів містить органели та їх включення, які утворюють наступні апарати:

- 1) Скорочувальний.

- 2) Передачі збуджень.
- 3) Опорний.
- 4) Енергетичний.
- 5) Синтетичний.
- 6) Лізосомальний.

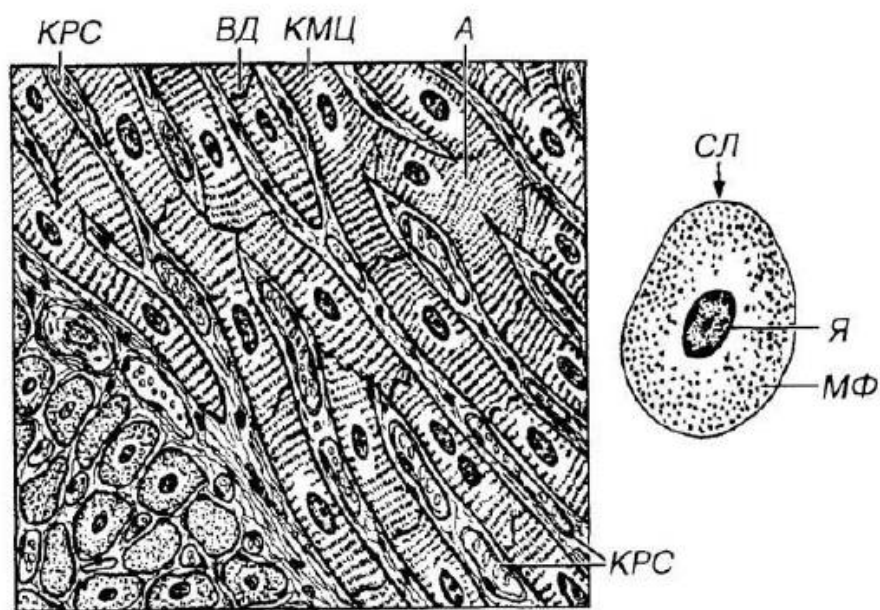
Скорочувальний апарат займає до 50-70 % об'єму кардіоміоцитів, які знаходяться у шлуночках. Апарат передачі збуджень в кардіоміоцитах схожий на той, що знаходиться у скелетних м'язових волокнах, але має певні особливості:

- 1) Саркоплазматична мережа менш активно накопичує кальцій, не утворює термальних систем. Під час розслаблення виділяє іони кальцію до саркоплазми з низькою швидкістю, що забезпечує автоматизм міоцитів.
- 2) Поперечні т-трубочки містять компоненти базальної мембрани та разом з елементами саркоплазматичної мережі утворюють діади. Т-трубочки яскраво виражені у міоцитах шлуночків та майже не зустрічаються у міоцитах передсердь. Іони кальцію проникають до саркоплазми не лише через саркоплазматичну мережу, а і через т-трубочки та сарколему із міжклітинного простору.

Опорний апарат кардіоміоцитів представлений елементами цитоскелету, які забезпечують впорядковане місцезнаходження міофіламентів та міофібрил всередині волокна. Окрім цього, в апараті наявна також базальна мембрана та сарколема. Її структурна та біохімічна організація схожа на ту, що наявна у скелетних м'язових тканинах. У кардіоміоцитах особливістю опорного апарату є те, що елементи цитоскелету пов'язані з особливими міжклітинними сполуками – вставними дисками. Сарколема містить інтегрини – трансмембранні глікопротеїни, які опосередковують зв'язок елементів цитоскелету кардіоміоцитів з компонентами міжклітинної речовини. Зовні сарколема кардіоміоцитів оточена базальною мембраною, в яку вплітаються ретикулярні і тонкі колагенові волокна.

Вставні диски здійснюють зв'язок кардіоміоцитів один з одним. Під світловим мікроскопом вони мають вигляд поперечних прямих або зигзагоподібних смужок, що перетинають функціональне волокно серцевої м'язової тканини. За допомогою електронного мікроскопу можна визначити складну організацію вставного диска, що представляє собою комплекс міжклітинних з'єднань декількох типів. В області поперечних ділянок вставного диску сусідні кардіоміоцити утворюють численні інтердигітації, які пов'язані контактами типу десмосом і смужок злипання. Актинові філаменти прікріплюються до поперечних ділянок сарколемами вставного диска. В області вставного диску виявляються глікопротеїни кадгерини, які забезпечують кальцій-залежне адгезивне з'єднання кардіоміоцитів один з одним. На сарколемі поздовжніх ділянок вставного диску є численні щілинні з'єднання, що забезпечують іонний зв'язок кардіоміоцитів і передачу імпульсу скорочення.

Енергетичний апарат кардіоміоцитів представлений мітохондріями і включеннями, розщеплення яких забезпечує отримання енергії. Мітохондрії знаходяться між міофібрилами, біля полюсів ядра і під сарколемою. Вони дуже численні і великі (займають близько 35-40 % обсягу саркоплазми — значно більше, ніж у волокнах скелетної м'язової тканини), з щільно розташованими поперечними кристами, що в сукупності відображає високий рівень дихальної активності серцевої м'язової тканини. Мітохондрії кардіоміоцитів мають також властивість накопичувати кальцій у високих концентраціях [3].



КМЦ – клітини серцевої м'язової тканини, ВД – вставний диск, А – анастомози, Я – ядро, МФ – міофібрили, СЛ – сарколема, КРС – кровеносні судини.

Рисунок 1.1 – Серцева м'язова тканина

1.3 Потенціал спокою

Значення потенціалу спокою в різних типах кардіоміоцитів може варіюватися від -60 до -90 мВ.

Таблиця 1.1 – Концентрації іонів всередині та зовні мембрани [4]

Іони	Концентрації іонів, ммоль/л	
	Внутрішньоклітинна	Позаклітинна
K^{+}	124	2.2
Na^{+}	4	109
Cl^{-}	1.5	77

Значення потенціалу спокою для більшості кардіоміоцитів дорівнює -80 мВ. Основою для підтримання співвідношення концентрацій іонів в кардіоміоцитах є натрій-калієвий насос [1]. Цей механізм є електrogenним насосом. Він переміщує назовні на один позитивний іон більше ніж всередину, це, в свою чергу, утворює певний дефіцит позитивних іонів у внутрішньоклітинному середовищі.

Ще одним механізмом в утворенні потенціалу спокою є дифузія іонів калію та іонів натрію через мембрану. Канали в мембрані клітини мають більше значення проникності для іонів калію ніж для натрію, тому, саме калій має найбільший вплив у формуванні від'ємного значення потенціалу спокою [2]. Але у випадку кардіоміоцитів провідну роль у формуванні значення потенціалу спокою грає саме натрій-калієвий насос. Він формує в середньому 5-10% потенціалу спокою, що в два рази більше, ніж в інших клітинах. Інактивація натрієвих та кальцієвих каналів кардіоміоцитів а також їх участь у формуванні потенціалу дії залежить від значення максимального потенціалу спокою кардіоміоцитів у діастолу. Саме для утворення найбільшої величини потенціалу спокою на мембрані, що унеможливорює коливання значення потенціалу спокою та утворює постійне значення початкового рівня збудження використовується натрій-калієвий насос [1].

Окрім того в кардіоміоцитах є ще кальцієвий насос. В нормальному стані іони кальцію мають набагато більшу концентрацію в зовнішньоклітинній рідині, ніж в всередині клітин. Таку різницю концентрацій забезпечують два кальцієві насоси. Один з них знаходиться у клітинній мембрані і переносить іони кальцію з клітини. Інший – перекачує іони кальцію у внутрішньоклітинні органели: мітохондрії, саркоплазматичний ретикулум [2].

1.4 Потенціал дії

Потенціал дії кардіоміоциту має характерну відмінність від потенціалу дії інших клітин. Ця відмінність полягає у тривалості: у кардіоміоцитах – 200-400 мілісекунд, а у нервових чи інших м'язових клітинах це значення у 100 разів менше.

Виникнення потенціалу дії залежить від зміни мембранного потенціалу та від зміни проникності для іонів. У випадку кардіоміоцитів – це іони калію, натрію та кальцію [4].

Потенціал дії серцевого м'язу відрізняється від скелетного тим, що потенціал дії скелетного м'язу виникає внаслідок активації швидких натрієвих каналів. Потенціал дії кардіоміоцитів виникає внаслідок активації швидких натрієвих каналів та повільних кальцієвих каналів. Основна різниця в тому, що натрієві канали відкриваються дуже швидко та так само швидко інактивуються, в той час, як кальцієві канали мають менший час активації та довше залишаються відкритими. Інша відмінність полягає в тому, що у кардіоміоцитах відразу після початку потенціалу дії знижується проникність мембрани для іонів калію в п'ять разів. Це явище запобігає швидкому поверненні мембранного потенціалу до значення потенціалу спокою.

Потенціал дії кардіоміоциту можна розділити на декілька частин або фаз.

Перша фаза – фаза швидкої деполяризації. При будь-якому впливі на клітину кардіоміоциту, в результаті якого мембранний потенціал зміститься від -90 мВ до -60 мВ відбудеться виникнення потенціалу дії. -60 мВ – це значення, яке називають порогом стимуляції кардіоміоциту [2]. Досягнувши цього значення мембранного потенціалу відкриваються безліч натрієвих каналів, які забезпечать вхід натрію всередину клітини, що в свою чергу забезпечить подальше зростання потенціалу до значення рівноважного значення потенціалу натрію – 70 мВ. Через декілька мілісекунд значення мембранного потенціалу досягає 30 мВ і натрієві канали закриваються та починають відкриватися калієві канали, які починають фазу

реполяризації мембрани. В період відкриття калієвих каналів кардіоміоцити не можуть реагувати на збудження. Це явище називається абсолютна рефрактерність [1]. Тривалість цього явища залежить від тривалості потенціалу дії. Період рефрактерності міокарду запобігає порушенню насосної функції серця. Цей період встановлює частоту скорочень [4].

Друга фаза – фаза плато потенціалу дії. Вона зумовлена тим, що кальцієві канали при збудженні клітини мають набагато більший час активації, ніж натрієві. Поріг стимуляції для кальцієвих каналів становить -30 мВ [4]. Відкриття кальцієвих каналів затримує процес реполяризації. Струм, який зумовлений кальцієвими каналами врівноважує струм калієвих каналів. Тривалість цієї фази дорівнює тривалості періоду абсолютної рефрактерності. Цей період дорівнює приблизно 300 мс.

Третя фаза – фаза реполяризації потенціалу дії. Ця фаза починається після закриття кальцієвих каналів та зумовлена лише струмом іонів калію [4].

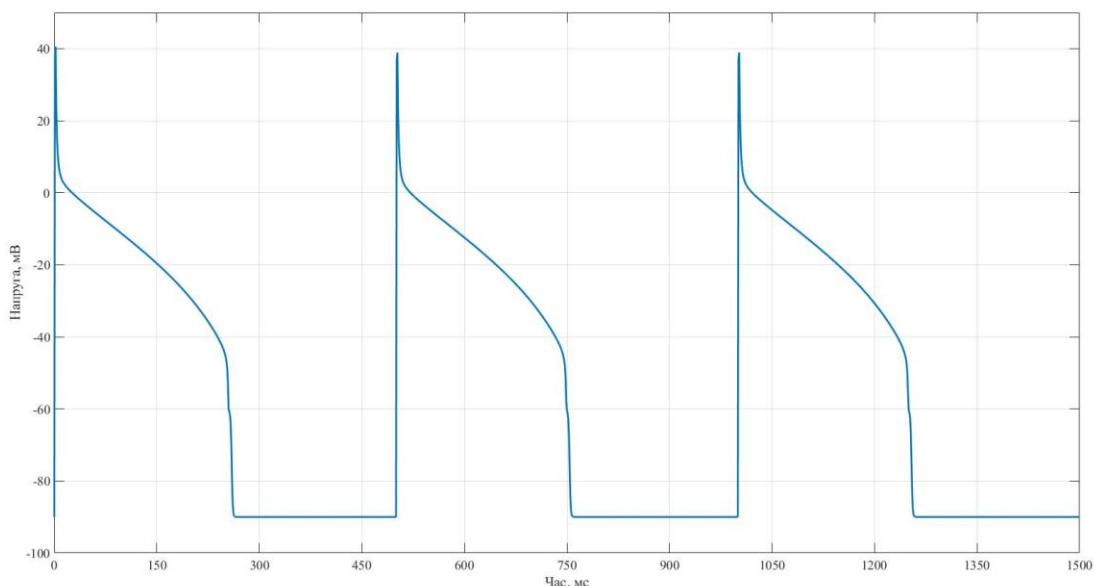


Рисунок 1.2 – Потенціал дії кардіоміоциту

1.4 Висновки до розділу 1

В першому розділі було розглянуто фізіологічні особливості функціональних одиниць серцевого м'язу – кардіоміоцитів. Були описані особливості будови кардіоміоцитів та причини такої будови, внутрішні структури кардіоміоцитів та порівняння з іншими типами м'язової тканини. Міститься детальний опис формування потенціалів спокою та дії кардіоміоцитів.

2 БАГАТОФОТОННА МІКРОСКОПІЯ

Звичайні конфокальні мікроскопи забезпечують збудження флуоресценції тільки у видимому діапазоні. Багато флуорохромів, що використовуються біологами, збуджуються світлом в ближньому ультрафіолетовому діапазоні, включаючи популярні кальцієві індикатори і ДНК-мітки. Для цього кілька років тому деякі виробники пропонували використовувати конфокальні мікроскопи, оснащені ультрафіолетовими лазерами. Ці системи страждали багатьма недоліками. Наявні в той час лазери були громіздкими і важкими.

Ультрафіолетове світло токсичне для живих клітин і викликає сильне знебарвлення флуорохромів вище і нижче площини фокуса, обмежуючи здатність цих мікроскопів збирати тривимірні набори даних. Крім того, доступні прилади не були пристосовані до кальцієвих ратіометричних барвників. Вирівнювання променя також було складним і потенційно небезпечним.

Ультрафіолетові лазери також є серйозною оптичною проблемою для проектування мікроскопу. У конфокальній мікроскопії падаюче світло повинно бути сфокусоване точно на тому місці, куди направлений об'єктив. Але лінзи мікроскопа не коригуються, щоб мати однакові фокуси для ультрафіолетового і видимого світла. Тому ультрафіолетова конфокальна система вимагає компенсаційної оптики, налаштованої спеціально на індивідуальні об'єкти.

Ультрафіолетова-конфокальна система була складним та дорогим компромісом, і її популярність була обмежена. Коли темно-фіолетові діодні лазери стали доступні, всі виробники відмовилися від справжніх ультрафіолетових-конфокальних променів. Недавня поява напівпровідникових лазерів ультрафіолетового діапазону зменшує вартість і фактори складності, пов'язані з аргоновими лазерами, але інші проблеми залишаються, тому дані лазери не стали частиною будь-якої комерційної системи [5].

2.1 Використання багатофотонної мікроскопії у нейронауці

З моменту першого повідомлення про двофотонну флуоресцентну мікроскопію пройшло більше 10 років. Багатофотонна мікроскопія знайшла застосування в багатьох областях досліджень. Даний тип досліджень мав особливо сильний вплив на біологію, оскільки деякі з його властивостей забезпечують особливі переваги для вивчення живих клітин в інтактній тканині.

Кора головного мозку людини містить близько 10^{10} нейронів з приблизно 10^{14} синаптичними зв'язками між ними. Багатофотонна мікроскопія допомогла виявити передачу нейронних сигналів у майже неушкодженій живій тканині на рівнях від окремих синапсів до цілих нейронних мереж. Вона використовується для дослідження розвитку, структурної пластичності, моделювання збудливості і синаптичної інтеграції. Багатофотонна мікроскопія виявилася особливо потужною при використанні в поєднанні з досягненнями в області флуоресцентних методів маркування тканин, електрофізіології та молекулярної біології. Наразі використовують у нейробиологічних дослідженнях тип мікроскопії, який заснований на двофотонному збудженні.

Флуоресценція - це використання світла на одній довжині хвилі для стимуляції випромінювання світла на іншій. Вхідний фотон віддає свою енергію електрону, приводячи його в збуджений стан, на більш високий енергетичний рівень, який він може займати тільки тимчасово. Через наносекунди, електрон втрачає цю енергію і переходить на нижчий рівень. Енергія випускається у вигляді іншого фотона. Оскільки при цьому втрачається деяка енергія, отриманий фотон має меншу енергію, ніж той, який спочатку збуджував молекулу. Нижча енергія відповідає більшій довжині хвилі, що описується законом Стокса, який говорить, що випромінювана довжина хвилі більше, ніж збудлива. Різниця в довжині хвилі,

відома як зміщення Стокса, змінюється від одного флуоресцентного барвника до іншого.

Для звичайної флуоресцентної мікроскопії барвник з великим стоксовим зміщенням дозволяє легко відокремити вхідні фотони від вихідних.

Двофотонне збудження збуджує флуоресценцію з фотонами більшої довжини хвилі, ніж випромінюване світло.

Здебільшого електрон виявляється в точно такому ж збудженому стані, перш ніж перейти до основного стану, так що випромінювана флуоресценція ідентична тій, що випускається при нормальному однофотонному збудженні. Таким чином, є можливість збуджувати барвники за допомогою далекого червоного або ближнього інфрачервоного світла. Однак, шлях збудження не завжди ідентичний однофотонному випадку.

Як правило, флуорохром збуджується двома фотонними подіями приблизно в два рази більшою довжини хвилі, необхідною для однофотонного збудження, але спектр двофотонного збудження часто буває зміщений у синій діапазон.

В принципі, правила відбору вимагають, щоб симетрична молекула могла бути збуджена тільки двома фотонами до іншого енергетичного стану, ніж при однофотонному збудженні, тому спектри збудження будуть зовсім іншими.

Поперечний переріз збудження (тобто ймовірність виникнення збудження) не має лінійної залежності від поперечного перерізу однофотонного збудження, тому барвник, який дуже ефективний для однофотонної флуоресценції, може бути набагато менш ефективним у двофотонному режимі (або навпаки). Наприклад, наявність триплетного стану з енергетичним рівнем приблизно в половину рівня однофотонного збудження може сприяти двофотонному збудженні (навіть якщо електрон фактично не займає цей стан в процесі). Тому барвники розробляють спеціально для двофотонної мікроскопії.

Багатофотонне збудження - це процес, в якому енергія для збудження однієї молекули надходить від двох або більше фотонів, які поглинаються практично в один і той же час. Кожен фотон повинен вносити тільки частину загальної енергії,

необхідної для переходу, за умови, що загальної кількості енергії достатньо. Наприклад, двофотонне збудження зазвичай досягається при довжинах хвиль збудження в ближньому інфрачервоному діапазоні від 700 до 1000 нанометрів, що приблизно в два рази більше, ніж при однофотонному збудженні. З появою надшвидких лазерів стало можливим використовувати багатофотонне збудження на практиці.

При звичайних інтенсивностях світла двофотонне збудження набагато менш імовірне, ніж однофотонне збудження. Для багатофотонного поглинання два або більше фотонів повинні бути поглинені протягом тимчасового вікна 10^{-15} секунд. Однак генерування значного числа таких подій при безперервному освітленні може призвести до руйнування зразку і споживати велику кількість енергії.

Надшвидкі лазери генерують субпікосекундні імпульси що призводить до високої миттєвої інтенсивності пучка світла, але, в той самий час, низької середньої потужності пучка [6].

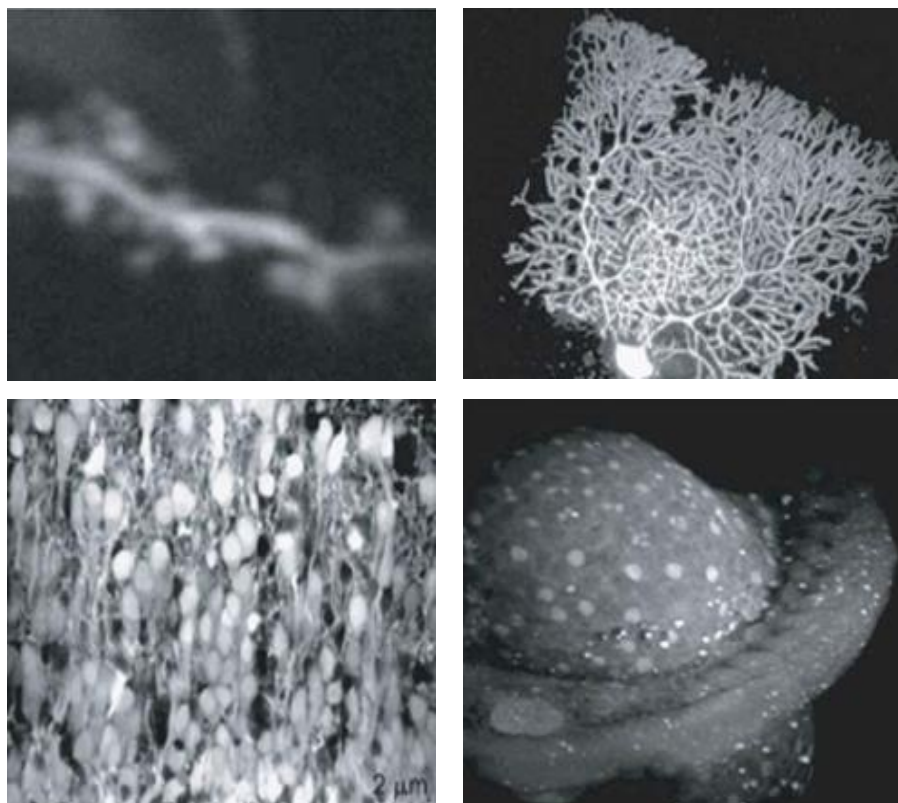


Рисунок 2.1 – Зображення елементів нервової системи за допомогою багатофотонної мікроскопії

2.2 Переваги двофотонного збудження

Двофотонна візуалізація пропонує ряд очевидних переваг в порівнянні з однофотонною:

- 1) Оскільки двофотонні події можуть відбуватися тільки сфокусованим світлом, знебарвлення вище і нижче площини фокусу виключається. У звичайній конфокальній системі конус світла вище і нижче цієї плями також здатний збуджувати і змінювати зображення флуоресцентної мітки.
- 2) Проникнення збудливого світла в тканини збільшується щонайменше в один раз. Розсіювання світла в каламутному середовищі

безпосередньо пов'язане з довжиною хвилі, тому довші хвилі проникають в клітини набагато краще. Існує врівноважуючий ефект - коли відбувається перехід до інфрачервоного випромінювання, вода починає поглинати світло, але у діапазоні між 700 і 1200 нанометрів виграш від зменшеного розсіювання перевищує втрати через поглинання.

- 3) Збудливе світло знаходиться в межах діапазону, в якому лінзи мікроскопа працюють ефективно, усуваючи або спрощуючи оптичні поправки. Лінзи мікроскопа зазвичай розраховані на діапазон приблизно від 700 до 400 нанометрів, так що ультрафіолетове збудження при 350 нанометрах лежить поза хроматичної корекції об'єктива, на відміну від двофотонного збудження при 700 нанометрах.
- 4) Немає необхідності в конфокальній щілині. Оскільки двофотонні дослідження відбуваються тільки у фокусі освітлювального пучка, двофотонна мікроскопія є глибинно-селективною навіть з широкосмуговим детектором. Насправді, хроматична корекція стає майже недоречною, тому що необхідно привести у фокус випромінювання лише на одній довжині хвилі.
- 5) Довгохвильове світло менш шкідливе для живих клітин, ніж ультрафіолетове світло. Багато експериментів показали, що при багатофотонному зображенні життєздатність клітин збільшується в порівнянні з аналогічними однофотонними умовами.

Оскільки нервова тканина, як і більшість інших живих тканин, ворожа до поширення світла, якість зображення швидко погіршується з глибиною, і оптична мікроскопія високої роздільної здатності в основному обмежується поверхнею тканини. З цієї причини частини мозку часто вивчаються в штучному середовищі. Хоча такий підхід дозволяє проводити оптичні дослідження окремих живих нейронів, клітинні властивості в тій чи іншій мірі залежать від процедур розсічення і дисоціації. Але збільшена глибина проникнення багатофотонної мікроскопії

дозволяє візуалізувати нейрони з високим просторово-часовим розширенням у відносно товстих зразках мозкової тканини. Таким чином, багатофотонна мікроскопія застосовується до все більшого числа інтактних препаратів. У мозкових зрізах вона істотно розширила можливості вивчення синаптичної інтеграції та дендритної обробки, зокрема на рівні окремих синапсів. Крім того, даний тип досліджень дозволив спостерігати дендритне збудження в інтактному мозку, причому останні технологічні розробки припускають, що така функціональна візуалізація з високою роздільною здатністю можлива навіть у пацієнтів, які будуть знаходитись у свідомості під час експерименту [6].

2.3 Вплив флуоресцентного випромінювання на живі тканини

Візуалізація високої роздільної здатності в інтактному мозку була б неможлива без перифокального утримання, що дозволяє дуже ефективно збирати флуоресценцію. Це пояснюється тим, що інформація з високою роздільною здатністю міститься практично у всіх генерованих флуоресцентних фотонах, які, як відомо, походять з перифокальної області і тому все ще корисні навіть після розсіювання. З відповідними розташуваннями детектора, зібрання світла флуоресценції можна таким чином збільшити без збільшення похибки. З тієї ж причини даний метод часто менш руйнівний впливає на тканини, ніж звичайне однофотонне збудження. Для вивчення живої тканини таке зменшення пошкоджень збільшує можливу тривалість або число повторень експерименту [6].

2.4 Лазери для багатофотонної мікроскопії

Лазери, що використовуються для отримання імпульсів зазвичай є твердотільними титан-сапфіровими.

Цей лазер має діапазон випромінювання між 700 і 1000 нанометрами. На жаль, налаштування лазера з однієї довжини хвилі на іншу вимагає часу, тому неможливо зобразити одну і ту саму область з двома різними довжинами хвиль у швидкій послідовності.

Однак в цій області спостерігається швидкий прогрес. У минулому доводилося використовувати маніпулятори і робити компенсуючі регулювання при налаштуванні, але тепер автоматизовані титан-сапфірові лазери мають комп'ютерне управління для вибору довжини хвилі і не вимагають перебудови, хоча мають трохи менший діапазон налаштування - зазвичай від 750 до 950 нанометрів - ніж лазери з ручним керуванням.

Даний лазер повинен бути накачаний іншим лазером. Як правило, номінальна ефективність становитиме близько 10 відсотків, так що лазер потужністю 500 МВт вимагає 5 Вт, щоб накачати його. Для накачування використовуються твердотільні неодимові лазери. Випромінювання від цих лазерів виходить в інфрачервоному діапазоні, при 1050 нм, а потім відбувається подвоєння частоти за допомогою кристалу оксиду берилію літію, який генерує другу гармоніку при 525 нм. Ці лазери досить малі, щоб поміститися в одному корпусі з основним лазером. Сам неодимовий лазер повинен бути накачаний червоним світлом від двох або більше потужних діодних лазерів, які завжди встановлені зовні і з'єднані масивом оптичних волокон.

Імпульси лазера мають довжину всього в кілька довжин хвиль, тому вони не є монохроматичними. Насправді, можна оцінити довжину імпульсу, вимірюючи розкид довжин хвиль. Цей розкид представляє проблему, коли лазерні імпульси повинні проходити через дисперсне середовище, як в оптичних компонентах.

У минулому кілька виробників експериментували з волоконно-оптичним зв'язком, але тепер всі відмовилися від цього. Тому для підтримки громіздкого лазера на одній площині з мікроскопом потрібно встановити його на оптичний стіл, що збільшує складність і розмір системи. Навіть об'єктив мікроскопа, який містить велику товщину скла, викликає дисперсію, яка подовжує імпульси, тому фактична довжина імпульсу на зразку, ймовірно, буде більше, ніж у лазера [5].

2.5 Застосування барвників для виявлення мембранних потенціалів клітин

Оптичне вимірювання мембранного потенціалу за допомогою молекулярного зонду може бути корисним в різних випадках. Однією з переваг є можливість одночасних вимірювань з багатьох місць. Це особливо важливо при вивченні нервової системи і серця, в яких одночасно активні багато частин окремої клітини, багато клітин або багато областей. Крім того, такий метод забезпечує можливість запису з процесів, які занадто чутливі або малі для електродного запису.

Однією з властивостей оптичних мембранно-зв'язаних барвників є чутливість до мембранного потенціалу. Більшість застосувань пов'язані з флуоресценцією або поглинанням. Ці барвники забезпечують пряме, швидке і лінійне вимірювання зміни мембранного потенціалу забарвлених мембран. Однак барвники можуть мати дуже різні реакції на інші препарати, а отже, і десятки барвників зазвичай повинні бути протестовані, щоб отримати максимально можливий результат.

В минулому загальним недоліком було те, що барвник не проникав через сполучну тканину або через міжклітинний простір до мембрани, яка представляє інтерес.

Рисунок 1 ілюструє три якісно різних застосування в нейробіології, в яких візуалізація мембранного потенціалу виявилася корисною. Щоб побачити, як нейрон інтегрує свої синаптичні відгуки в утворення потенціалу дії, потрібно вміти вимірювати мембранний потенціал скрізь, де відбувається синаптичний вхід, і в тих місцях, де ініціюються спайки. Наступне зображення з рисунку 1 показує, що для того, щоб зрозуміти, як нервова система генерує поведінку, важливо одночасно виміряти потенційну активність багатьох нейронів, які беруть у цьому участь. Третє зображення на рисунку 1 демонструє приклад того, що реакції на сенсорні стимули і генерація моторного виходу в головному мозку хребетних часто супроводжуються синхронною активацією багатьох нейронів у широко поширених областях мозку; чутливі до зміни напруги барвники дозволяють одночасно вимірювати сигнали з багатьох областей. В цих трьох випадках оптичні записи надають інформацію про функціонування нервової системи, яка раніше була недоступна [6].

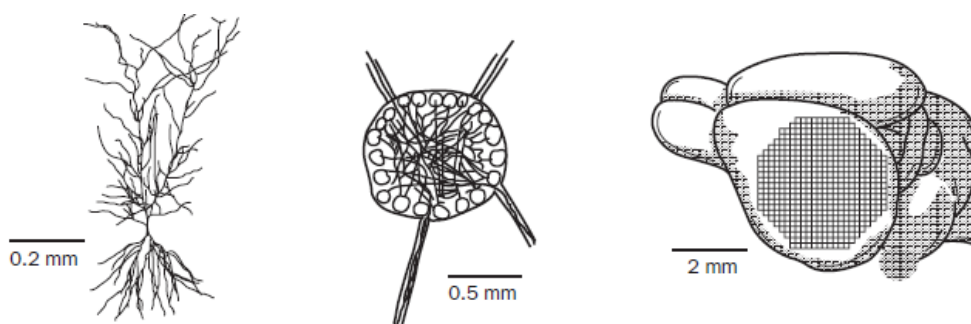


Рисунок 2.2 – Схематичне зображення нейрону, ганглії та частини головного мозку

2.6 Маркування клітин за допомогою барвників

Було виявлено, що більшість флуорофорів які традиційно використовуються для однофотонного збудження, володіють двофотонним поглинанням, достатнім для отримання зображень, хоча і не завжди при точно подвоєній довжині хвилі однофотонного збудження.

Особливо корисні в нейробіології флуоресцентні індикатори фізіологічних змінних. Більшість використовуваних сьогодні малих органічних молекул чутливі до мембранного електричного поля або концентрації іонів (наприклад, кальцію, натрію або хлориду). За винятком індикаторів електричного поля, ці індикатори є водорозчинними і завантажуються в клітини трьома основними шляхами: ін'єкцією через скляні піпетки в окремі клітини, зразки наносяться у ванну з індикаторами і прямим трансмембранним завантаженням. Завантаження окремих клітин досягається або за допомогою високоомного скляного мікроелектроду з подальшим іонтофорезом, або через пластир-піпетки з подальшим проникненням в цільну клітку і дифузії з піпетки в клітину.

Через неповне поглинання і захоплення барвника не нейронними структурами завантаження у зрізи мозку мало певні обмеження. Проте, нещодавно неокортикальні клітинні популяції були пофарбовані у живих тваринах шляхом прямої ін'єкції індикатора кальцію в мозок і згодом були візуалізовані з допомогою двофотонної мікроскопії.

Альтернативний підхід полягає в завантаженні індикаторів в ті місця, де процеси (зазвичай аксони) клітинної популяції становлять інтерес. В такому випадку молекули барвника дифундують або активно транспортуються вздовж аксонів на відстань до декількох міліметрів, утворюючи область, в якій тільки нейрональні компоненти завантажені барвником. Інший спосіб завантаження, це зробити можливим проникнення барвників крізь плазматичну мембрану. Це може бути досягнуто шляхом розміщення барвника в безпосередній близькості від

нейронів з подальшим застосуванням електричного поля або механічного збудження, що тимчасово порушує цілісність мембрани. Декстран-кон'юговані барвники таким чином добре завантажуються і підходять для дистанційного завантаження, оскільки транспортуються на великі відстані як антероградним, так і ретроградним способом.

Нещодавно, біолістичні методи були адаптовані для маркування клітин мембранними барвниками та внутрішньоклітинними індикаторами.

Відкриття та гетерологічна експресія флуоресцентних білків зробили революцію у флуоресцентній мікроскопії. Як білки, вони генетично кодуються, дозволяючи вивільнятися практично в будь-якому типі клітин, тим самим створюючи міст між флуоресцентною мікроскопією і інструментами молекулярної біології та генетики. Гени можуть бути перенесені в клітини різними методами, включаючи біолістичну трансфекцію, вірусну інфекцію і створення трансгенних тварин. Можна використовувати специфічні для клітинного типу промотори, що дозволяє вивільняти білок у чітко визначених субпопуляціях клітин [6].

2.7 Конфокальний мікроскоп

Конфокальний мікроскоп – це вид оптичного мікроскопу. В конфокальному мікроскопі об'єктив фокусує на певній області клітини, в той час, як у звичайному мікроскопі об'єктив фокусує на великій ділянці зразку. У випадку світлового мікроскопа освітлюється зона навколо зразку, що погіршує контраст і якість зображення. За допомогою особливостей конструкції конфокального мікроскопу є можливість покращити якість зображення та запобігти утворенню несфокусованого світла. Приклад порівняння зображень наведено на малюнку нижче:

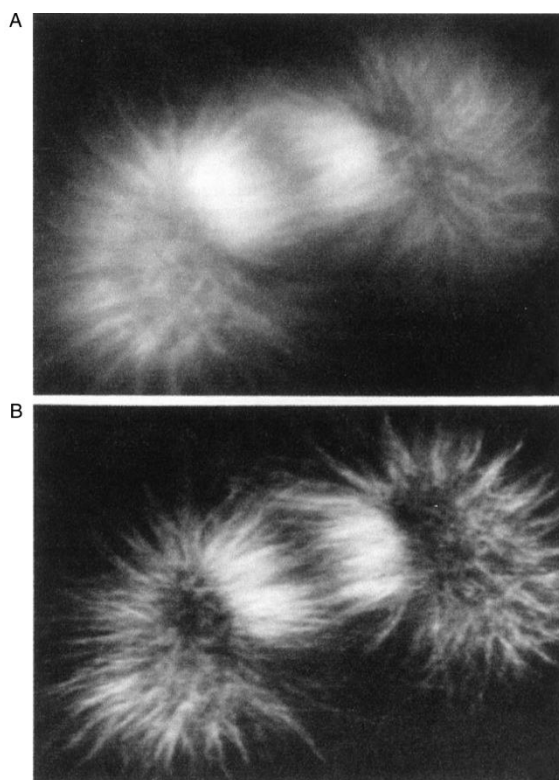


Рисунок 2.3 – Порівняння зображень звичайного світлового мікроскопу (А) та конфокального (В)

Діаметр світлової плями, яку фокусують на зразку варіюється від 0.25 мікрометрів і до 0.5 мікрометрів в глибину при максимально можливих параметрах інтенсивності лазерного променю. Дані значення можуть залежати від об'єктиву. У конфокальному мікроскопі зразок проходить декілька етапів сканування. Зображення утворюється шляхом руху світла по структурі. Для запобігання утворення розфокусованого світла використовують фільтри. Фотоприймач сприймає лише сфокусоване світло із заданої області об'єкту, не сприймаючи світло з інших ділянок. Це дозволяє покращити зображення в порівнянні зі звичайним мікроскопом (рис. 2.3) [7].

2.7.1 Особливості конструкції конфокального мікроскопу

Конфокальний мікроскоп складається з декількох компонентів:

- 1) Мікроскоп. Конструкція може бути прямою або оберненою. Пряму конструкцію використовують для живих клітин які знаходяться у водному розчині. Обернена конструкція застосовується для живих клітин, що знаходяться у стерильних камерах або якщо необхідно проводити експеримент за допомогою мікроманіпуляторів. Для отримання максимально можливого результату досліджень існує необхідність використовувати для певних конфокальних мікроскопів специфічне програмне забезпечення, яке розроблялось під конкретну модель приладу. Додатково, до складу мікроскопу може входити пристрій, якій допомагає уникати впливу вібрацій під час дослідження зразку. Він контролює стабільність відстані до зразку з точністю до 0.025 мкм.
- 2) Лінзи. Даний компонент є одним з найважливіших для утворення чітких зображень. Лінзи виготовляють спеціально під модель мікроскопу. Прямі та обернені конструкції мають різні лінзи. Як правило, їх підбирають з великим значенням числової апертури. Цей параметр впливає на мінімальну ширину об'єкту, який сканують. Для запобігання аберацій необхідні додаткові налаштування. Одним з прикладів є сферична аберація (рис. 2.4).

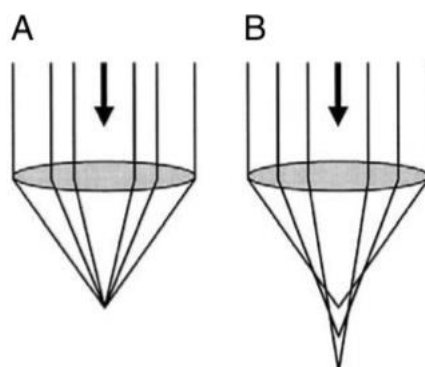


Рисунок 2.4 – Зразок А – налаштована лінза, зразок В – лінза зі сферичною аберациєю

Даний негативний ефект з'являється під час дослідження об'єктів, які мають велику товщину. Сферична аберация погіршує визначення об'єму предмету після обробки зрізів шарів об'єкту. Ще одним видом аберации - є хроматична аберация. Дана аберация характеризується явищами, при яких різні довжини хвиль випромінювання не здатні сфокусуватись у зразку. Наступним важливим параметром є робоча відстань об'єктиву. Це відстань між фокальною площиною зразку та найменшою структурною частиною об'єктиву. Чим менше це значення, тим кращою буде якість зображення. Ще однією характеристикою є вибір збільшення об'єктиву. Значення даного параметру є індивідуальним для кожного об'єкту. Його підбирають враховуючи мінімальне збільшення об'єктиву та якістю зображення об'єкту. Зазвичай, використовують комбінації з декількох об'єктивів в мікроскопі для одержання кращих результатів.

- 3) Джерело світла. Звичайні флуоресцентні мікроскопи мають ртутні або ксеноні лампи білого світла, які використовують як джерела світла. У конфокальних мікроскопах джерелом випромінювання можуть бути лазери (лазерний мікроскоп), ртутні або ксеноні дугові лампи (конфокальний мікроскоп із диском, який обертається). Перевага

надається лазерам, адже вони мають високу яскравість, малі шуми та здатність до фокусування в маленьку ділянку. Лазери можуть бути як в інфрачервоному чи видимому спектрі випромінювання, так і в ультрафіолетовому. Для того, щоб була змога працювати з різними барвниками використовують конструкцію, яка складається з декількох лазерів. Відносно лазеру налаштовують фільтр. Найчастіше застосовують акустооптичний фільтр. Даний фільтр допомагає зберегти колір при скануванні зразку з різними барвниками, які мають різні характеристики збудження. Ресурс лазеру складає від 2000 годин до 15000 годин.

- 4) Скануюча головка. Дана частина конструкції є найбільш варіативною. Вона включає в себе скануючу систему, яка сканує одну чи декілька світлових плям на зразку растровим малюнком. Сканування відбувається як горизонтально так і вертикально. Скануючі дзеркала – невід’ємна частина конструкції мікроскопу. Вони направляють світло від фокальної площини до фотоприймача. Дзеркала можуть бути багатокутними та обертатись; гальванометричними; два гальванометричних – одне для горизонтального сканування, інше для вертикального; системою з чотирьох дзеркал, які утворюють два гальванометричні дзеркала. В скануючій головці знаходиться конфокальна діафрагма. Розмір діафрагми варіюється для отримання кращої візуалізації. Скануюча головка також має один або декілька фільтрів для блокування небажаних хвиль світла до того, як вони надходять до фотоприймача [7]. Дзеркала повинні бути легкими, щоб забезпечити високу швидкість сканування. Дзеркала розміщують на площині, яка спряжена з задньою фокальною площиною об’єктиву. Лише це місце дозволяє правильно перенести траєкторію руху променя від лазеру до зразку. Якщо не виконати ці умови, то зображення може ставати темнішим по кутам, адже під час переміщення не весь промінь буде попадати на об’єктив. Теоретично, ідеальним буде використання лише одного дзеркала, адже в такому випадку ефективність

буде максимальною, але переміщення по зразку в двох напрямках в такому випадку буде потребувати більш складної конструкції, яка утримує дзеркало, тому в більшості мікроскопів використовують дуальні дзеркала. Для прискорення сканування деякі виробники використовують опуклі дзеркала. Конструкція запобігає утворенню аберацій та великих втрат [5].

- 5) Фотоприймач. Розташовується або поруч зі скануючою головкою, або незалежно від конфокальної системи. Детектор зазвичай малошумний, високочутливий фотоелектронний помножувач, який перетворює енергію світла у електричну енергію. Світло збуджує люмінофор і створює електрони, які потім збираються та помножуються на сигнал для відображення на моніторі. Фотоелектронний помножувач використовується в якості приймача через його швидкість спрацьовування, чутливість, високе співвідношення сигнал-шум та широкий динамічний діапазон. У деяких конфокальних мікроскопах може бути декілька помножувачів для візуалізації зразків з різноманітними мітками. Один із варіантів фотоприймача може мати у своєму складі призму, яка розбиває світло на спектр від 400 до 750 нм. Цей спектр направляють на фотоприймач перед яким знаходиться щілина яка утворена двома дзеркальними пластинами. Ширину щілини можна варіювати для знаходження будь-якої частини спектру. Ця щілина є фільтром будь-якої смуги пропускання в будь-якому місці спектру.
- 6) Комп'ютер. Більшість конфокальних систем використовують комп'ютери в якості машини керування та аналізу отриманих даних. За допомогою комп'ютеру змінюють інтенсивність випромінювання лазера, розмір конфокальної апертури, підсилення помножувальної трубки, обирають різні типи фільтрів та переміщують скануючі дзеркала. Ці всі налаштування відбуваються через програмне забезпечення для керування мікроскопом. Залежно від вибору розширення зображень змінюється час

сканування. Він може бути від 2.08 мс до 158 с. Чим більше розширення потрібно, тим довше буде відбуватись сканування зразку [7].

2.7.2 Переваги та недоліки конфокального мікроскопу

Конфокальному мікроскопу не має необхідності фіксувати зразок, також він не має шкідливого впливу на живі зразки. В свій час звичайні світлові мікроскопи дозволяють досліджувати живі та нерухомі клітини та мають широкі можливості до візуалізації зображень, включаючи флуоресценцію, але ці мікроскопи не можуть працювати з дуже малими зразками. Їх розширення обмежене 0.2 мікрометрами. Також звичайний світловий мікроскоп може страждати від розфокусування і в результаті отримувати нечіткі результати навіть після обробки зображень на комп'ютері.

Конфокальний мікроскоп в свою чергу не має такої проблеми, адже він сканує зображення кожного разу на іншій глибині, роблячи зрізи зразку. Такий принцип виключає будь-які можливі артефакти, які спостерігаються у звичайному світловому мікроскопі і дозволяє з більшою чіткістю спостерігати зразки. Мала глибина різкості (0.5-1.5 мкм) дозволяє сканувати не всю товщину зразку повністю, а лише на певній глибині. Приймач не збирає не сфокусоване світло, тому зображення буде чорного кольору поки мікроскоп не буде сфокусований. Це дозволяє підвищувати чіткість зображення, чутливість виявлення. Також конфокальний мікроскоп дозволяє робити сканування в будь-якому напрямі: горизонтально, вертикально або вглиб.

Але як завжди, є і мінуси технології. Оскільки мікроскоп в якості світла використовує лазер, то діапазон випромінювання обмежений довжиною хвилі для лазерного випромінювання. У звичайному світловому мікроскопі використовуються ртутні або ксенонові лампи, тому спектр випромінювання

знаходиться від інфрачервоного діапазону до ультрафіолетового. Також для певних клітин інтенсивність лазерного променю може мати негативний вплив на них.

Найбільш очевидним недоліком конфокального мікроскопу є ціна. Звичайний світловий мікроскоп для флуоресцентного дослідження може бути в 10 разів дешевший за конфокальний [7].

2.7.3 Застосування конфокального мікроскопу у вимірюванні мембранного потенціалу

Для вимірювання мембранного потенціалу за допомогою конфокального мікроскопу існують спеціальні потенціометричні барвники. Такі барвники дозволяють вимірювати мембранні потенціали як великої популяції клітин, так і напруги однієї клітини. Конфокальна мікроскопія може дуже сильно розширити можливості дослідження клітин та вимірювання їх електричних властивостей. Мікроскоп дозволяє не лише покращити розширення зображення, а і може допомогти в кількісних вимірюваннях інтенсивності світіння флуоресцентних барвників всередині клітини. Існує навіть метод зображення клітин за допомогою такого оптичного явища, як генерація другої гармоніки. За допомогою такого методу можна передавати у зразок сигнали, які є дуже чутливими до мембранного потенціалу.

Першим загальним методом конфокальної мікроскопії є фарбування мембрани за допомогою швидких потенціометричних індикаторів. Методи досліджень за допомогою потенціометричних індикаторів розроблялись для спостереження активності у складних нейронних системах. Це потребує швидкої реакції індикатору, щоб можна було контролювати зміни напруги, які відбуваються під час утворення потенціалу дії. Зміна флуоресцентного світіння при утворенні потенціалу дії досягає в найкращому випадку збільшення світіння на 10-20 % ніж

у стані спокою. Така низька різниця у світінні, а також потреба у барвниках з високою початковою яскравістю світіння для того, щоб була змога спостерігати сигнали у мілісекундному діапазоні не залишала вибору вченим використовувати лише низьке просторове розширення зображень. Для вирішення цих проблем вченими був розроблений клас стирильних потенціометричних барвників. Принцип роботи – зміна мембранного потенціалу викликає зсув (емісію) у спектрі випромінювання барвнику і це дозволяє отримати зображення із подвійним співвідношенням довжин хвиль.

Інший метод заснований на зміні флуоресценції резонансного переносу енергії, коли аніонний акцепторний барвник піддається потенціалзалежному перерозподілу по мембрані і тим самим змінює своє положення відносно донору, який знаходиться на зовнішній поверхні мембрани. Зміна світіння при такому методі – 50% на 100 мілівольт зміни напруги. Такий метод достатньо чутливий, щоб відслідковувати потенціали дії в клітині. Але щоб викликати достатньо ефективну передачу енергії потрібно збільшувати концентрації барвнику, а це є токсичним для клітини. Цей метод не набув ще поширення у дослідках і був випробуваний лише для складних багатоклітинних препаратів. Але, з іншої сторони в такому методі є великий потенціал, особливо якщо вдасться об'єднати донорний і акцепторний хромофор в одну молекулу.

Ще один метод полягає у тому, що у калієвий канал гену шейкер додають зелений флуоресцентний білок. Такий метод дає зміну світіння у 5% на 100 мілівольт зміни потенціалу. Хоча такий варіант дослідження є набагато повільнішим і не дає змогу дослідити всі процеси зміни напруги в клітині, але в нього є переваги у вигляді селективності та неінвазивності.

На сьогоднішній день такі барвники не застосовуються з конфокальним мікроскопом. Мікроскоп надає більше високе розширення за рахунок зменшення інтенсивності світіння барвників. Практичне застосування конфокальної мікроскопії для вимірювання потенціалу дії знаходить лише при лінійному скануванні.

Ще одна велика область – це потенціометричні барвники з повільним розподілом. Це клас барвників які є мембранно-проникними іонами. Вони підпорядковуються рівнянню Нернста. Через різницю потенціалів мембрани барвник нерівномірно розподіляється поза та всередині мембрани. Але барвник може з'єднуватись із плазмою і утворювати інші речовини та порушувати очікуваний розподіл. Тому такі барвники дуже чутливі до зміни потенціалу, адже при змінах напруги можуть вступати в реакції не тільки з плазмою, а і з мітохондріями всередині клітини. Для якісних результатів потрібно дуже точно калібрувати прилад.

Наступним кроком стала розробка катіонних барвників. Ідея була в тому, щоб замінити інтенсивність флуоресценції на концентрацію барвників в рівнянні Нернста. Для цього необхідно було створити барвники для яких світіння було б пропорційним до їх концентрації. В цьому випадку необхідно було вирішити декілька проблем, наприклад, барвники, які сильно впливають на мембрану мають більш складний розподіл, який не підпорядковується рівнянню Нернста. Також треба було враховувати, що процес встановлення рівноваги Нернста повинен бути швидким та повністю оборотним, щоб була змога досліджувати динамічні зміни в часі.

Для дослідження потенціалів дії за допомогою конфокального мікроскопу використовують два явища: двофотонне збудження та генерацію другої оптичної гармоніки.

Техніка генерації другої оптичної гармоніки передбачає взаємодію електромагнітного поля світлового пучка на половині довжини хвилі падаючої хвилі. Інтенсивність сигналу в такому випадку так само пропорційна квадрату інтенсивності падаючого світла, як і при двофотонному збудженні. У випадку застосування такого методу необхідно встановити додаткові об'єктиви, які будуть збирати світло, а також треба підібрати фільтри, які не будуть пропускати до цього об'єктиву основну частину відбитого світла, щоб не зменшувати якість підсилення, яке надає цей метод.

Генерація другої гармоніки підсилюється електрохромними барвниками. Ці барвники, окрім того, що відповідають за підсилення ефекту, також реагують на зміну електричного поля. Це виявляється через зміну чутливості спектру барвнику. В результаті експерименту виявили зміну у 4 відсотки на 10 мВ, порівняно з 1-2 відсотками на 10 мВ для зміни флуоресценції [7]. Тому такий метод можна вважати найбільш вдалим у конфокальній мікроскопії для розрахунку мембранних потенціалів. Для покращення результатів потрібно буде шукати та розробляти нові види барвників, які зможуть більш точніше реагувати на зміну електромагнітного поля, удосконалювати лазери та фільтри, розширювати спектр чутливості об'єктивів, щоб була можливість працювати на більшому діапазоні довжин хвиль.

2.7.4 Шуми в конфокальному мікроскопі

Існує два види випадкових шумів в мікроскопі: електронний шум та дробовий шум. Одним із джерел шуму буде темновий струм. Це струм при відсутності освітлення. Для запобігання впливу темного струму на кінцевий результат фіксують певний поріг вище якого струм буде фіксуватися, а все що нижче – ні. Джерелом темного струму є випадковий тепловий рух електронів. Підсилювач також може піддаватися впливу теплового шуму, тому для кращого співвідношення сигнал/шум детектори охолоджують. Якщо мікроскоп не працює правильно, то дробовий шум завжди буде головною проблемою. Цей шум наявний як в конфокальній, так і в широкосмуговій мікроскопії [5].

2.8 Висновки до розділу 2

В даному розділі було розглянуто принципи багатофотонної мікроскопії, описано принципи двофотонного збудження. Окрім цього, наявна інформація про структурні особливості мікроскопів, зокрема побудову та принцип роботи конфокального мікроскопа.

3 АНАЛІЗ МЕДИЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ

Аналіз медичних зображень включає в себе надійне розпізнавання, виявлення та сегментацію об'єктів, що виявляється особливо складним завданням для довільних тривимірних анатомічних структур, враховуючи відмінності у місцезнаходженні, нежорстку природу форми, а також відмінності в анатомії між різними випадками. Багато рішень зосереджені в основному на задачі сегментації, наприклад, активні моделі форми і деформовані моделі. Тим не менш, для досягнення точної автоматичної сегментації довільних анатомічних структур необхідне надійне і ефективне рішення для локалізації об'єкту.

У порівнянні з іншими методами візуалізації (наприклад, магнітно-резонансна томографія, комп'ютерна томографія та ультразвук), мікроскопічні зображення демонструють унікальні характеристики організму. У цифровій гістопатології зображення зазвичай генеруються з певним хімічним фарбуванням і включають в собі фоновий шум, неоднорідну інтенсивність, зіткнення або накладення ядер та клітин.

Аналіз мікроскопічних зображень може покращити діагностику різних захворювань, таких як рак молочної залози, рак легень, пухлини головного мозку, тому він грає вирішальну роль в комп'ютерній діагностиці в клінічній практиці і патологічних дослідженнях [8].

Через великий обсяг даних зображень, який в даний час продовжує збільшуватися, їх аналіз вручну неефективний або навіть неможливий. Комп'ютеризовані методи дозволяють значно підвищити ефективність. Зокрема, методи машинного навчання широко і успішно застосовуються в медичній візуалізації та біологічних дослідженнях. Однак традиційні методи машинного навчання зазвичай не мають прямого відношення до необроблених даних, а в значній мірі покладаються на представлення даних, що вимагає значних знань у предметній галузі та інженерії.

Правильне представлення даних підвищує продуктивність багатьох алгоритмів машинного навчання. Проектування об'єктів, що генерують такі уявлення, для ефективного використання інформації, що закодована в даних, є особливо складним завданням. На практиці це вимагає складної попередньої обробки даних, яка погано узагальнюється між різними модальностями зображень. Причина цього полягає в тому, що більшість таких систем проектується вручну для конкретних додатків, щоб розпізнати та зрозуміти інформацію, приховану в даних, тому необхідні додаткові зусилля для проектування необхідних функцій і виявлення потрібної інформації.

У контексті об'ємного аналізу зображень машинне навчання використовується для виявлення анатомії та сегментації органів. В такому випадку завдання проектування об'єктів стає більш складним, оскільки вилучення об'єктів зазвичай виконується при складних перетвореннях, таких як довільні орієнтації або масштаби. Більш того, для високої оцінки параметрів вичерпне сканування простору параметрів недоцільно при експоненціальному збільшенні розміру простору по відношенню до розмірності простору, тобто числу розглянутих параметрів перетворення.

Всі ці проблеми можна подолати за допомогою відособленого простору глибокого навчання, який заснований на функціональному навчанні структури для підтримки ефективного аналізу довільних анатомічних структур. Для цього формують двоетапний підхід з використанням глибокого навчання, в якості потужного механізму для спільного вивчення ознак і вивчення завдань на кожному етапі: локалізація об'єкта і оцінка меж. Такий підхід спирається на обчислювальні переваги сканування ієрархічних параметричних просторів за допомогою механізму навчання маргінального простору. У разі обмеженого афінного перетворення, спочатку оцінюють місце розташування (тривимірний простір), потім місце розташування і орієнтацію, і, повне перетворення, включаючи анізотропне масштабування. Враховуючи жорстке перетворення об'єкта, пропонують використовувати засновану на глибокому навчанні активну модель

форми для управління деформацією форми. Для параметризації певного об'єкта система вивчає класифікатори у маргінальних просторах параметрів, тим самим фіксуючи зовнішній вигляд об'єкта при певних перетвореннях. Існує два принципових рішення для цього, одне з яких засноване на вичерпному скануванні гіпотез з використанням розширеної каскадної фільтрації і розрідженої функції вибірки, а друге - дотримання більш інтелектуальної схеми пошуку, вивчення оптимальних траєкторій у просторі параметрів, що ведуть до цільового розташування, що описує фактичне перетворення об'єкта [9].

3.1 Комп'ютерна діагностика для аналізу медичних зображень

Комп'ютерна діагностика стала одним з основних напрямків досліджень в області обчислювальної техніки медичних зображень та клінічної діагностики. Її застосовують для виявлення клінічно пов'язаних об'єктів за медичними зображеннями, таких як виявлення мітозу, ядер, церебрального мікроблиску, легеневих вузликів, відстеження клітин, локалізованих уражень. Загалом, клінічна процедура опису об'єктів, заснована на візуальному огляді та ручній локалізації страждає низькою відтворюваністю серед різних спостерігачів і може бути трудомісткою, особливо в контексті великої кількості суб'єктів. Надійне виявлення об'єктів у медичних зображеннях може звільнити лікарів від значного навантаження, забезпечити надійні кількісні оцінки і прискорити процедуру діагностики. Однак питання про те, як ефективно виявляти розріджено розподілені об'єкти на основі великомасштабних даних, все ще актуальне. Для ефективного виявлення існує кілька загальних проблем:

- 1) Існує висока внутрішньокласова варіабельність зовнішнього вигляду об'єкта на медичних зображеннях. Наприклад, мітоз характеризується великою різноманітністю конфігурацій форми, які пов'язані з високою

варіабельністю біологічних структур. Крім того, різні умови процесу отримання гістологічних зображень, включаючи відбір проб, розрізання, фарбування ще більш ускладнюють виявлення об'єктів. Це часто трапляється, коли зразки тканин беруться у різних пацієнтів або в різні часові інтервали.

- 2) Розріджено розподілені об'єкти вимагають, щоб алгоритм був ефективним і надійним при застосуванні до великомасштабних даних.
- 3) Спотворення можуть мати схожу структуру до об'єктів дослідження, які перешкоджають процесу виявлення, тому автоматичні методи повинні бути надійними і розрізнявальними, щоб виділити справжні об'єкти. У разі виявлення мітозу деякі типи клітин (наприклад, апоптотичні клітини) мають подібний морфологічний вигляд з мітозом, як показано в червоному прямокутнику на рисунку 3.1, що призводить до великої кількості хибнопозитивних результатів у процесі виявлення. Аналогічно, в задачі виявлення існує багато варіацій, наприклад, порожнини, кальцифікації і кавернозні пороки розвитку, сильно ускладнюють процес детекції.

Останнім часом, глибокі нейронні мережі зробили прорив у вирішенні завдань, пов'язаних з розпізнаванням зображень, включаючи виявлення об'єктів, семантичну сегментацію і класифікацію зображень. Прагнучи вирішити вищезазначені проблеми, вчені пропонують швидкий і точний метод виявлення розподілених об'єктів на медичних зображеннях шляхом розробки глибоких каскадних нейронних мереж. Виявлення мітозу з гістопатологічних зображень показали багатообіцяючі результати і високу узагальнюючу здатність даного алгоритму [9].

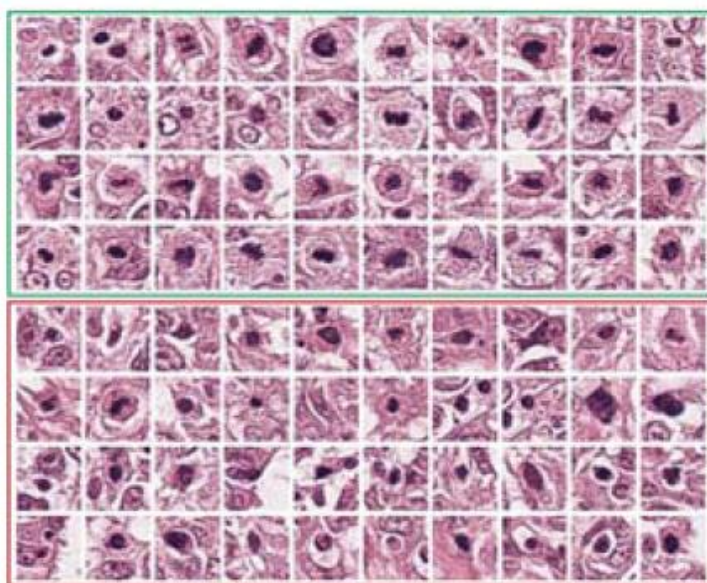


Рисунок 3.1 – Приклад зображень об'єктів досліджень та спотворень

3.2 Проблеми під час локалізації та сегментації об'єктів

Машинне навчання може бути використано для ефективної та надійної локалізації об'єктів. У такому випадку локалізація об'єкта формулюється як завдання класифікації по ділянках інтенсивностей зображень, визначених у певному параметричному просторі. Зазвичай класифікатор навчається з використанням дискретних позитивних і негативних гіпотез. Під час тестування класифікатор застосовується для вичерпного сканування простору параметрів. Розширення логіки до тривимірного простору, однак, не є простим. Якщо взяти до прикладу обмежене афінне перетворення, то даний тип жорсткого перетворення визначається дев'ятьма параметрами, що охоплюють дев'ятивимірний простір: для визначення місця розташування потрібні три параметри, три для захоплення орієнтації і три для визначення анізотропної шкали. Навіть при припущенні 10 можливих результатів для кожного параметра число гіпотез буде досягати 10^9 , що практично неможливо оцінити на будь-якому комп'ютері.

Крім того, зосередившись лише на вилученні ознак у кожному з цих просторів, можна зіткнутися з проблемою забезпечення ефективного обчислення ознак при складних перетвореннях, наприклад, довільні орієнтації або масштаби, без явного перетворення даних. Всі ці проблеми мотивують знаходити альтернативні методи розмежування, які не засновані на машинному навчанні, оскільки вони не вимагають великих баз даних зображень для оцінки моделі. Однак такі методи зазвичай страждають від ряду обмежень з точки зору стійкості до шуму і узагальнення [9].

3.3 Методи обробки зображень

3.3.1 Крива Без'є

Крива Без'є - це крива, що має безліч контрольних точок. Дана крива використовується для маніпулювання кадрами і рухом. Вона також може використовуватися для масштабування, вибору положення зображення, зміни або перетворення частини зображення[10]. На рис. 3.2 показана кубічна крива Без'є.

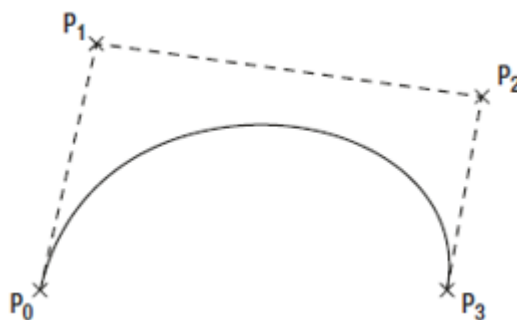


Рисунок 3.2 – Кубічна крива Без'є, p_0 - p_4 – контрольні точки [11]

3.3.2. Гамма-корекція

Гамма-корекція використовується для зміни яскравості зображення і може бути використана для зміни співвідношення червоного, зеленого і синього кольорів. Оскільки інтенсивність завжди вимірюється від нуля до одиниці, зображення на моніторі в цьому випадку стає нечітким. Щоб вирішити цю проблему, вхідне значення має бути змінено. Гамма-з'єднання зроблено так, що вихідне значення майже аналогічне вхідному. Наприклад, якщо вхідне значення підвищено до ступеня $1/2.5$, то цей процес називається гамма-корекцією 2.5. На рисунку 3.3 показано, як виглядає зображення з різними гамма-значеннями [10].



Рисунок 3.3 – Приклади гамма-корекції зображення [12]

3.3.3 Розгортка зображення

Загалом, розгортка використовується для корекції розмитих зображень, що допомагає відновити контраст. При розмитих зображеннях важко визначити інтенсивність пікселів. Щоб зробити цю поправку, використовують те, що називається функцією точкового поширення. Обирають точку всередині зображення і, використовуючи функцію точкового поширення, представляють точку зі світлом, що випускається з цієї точки, у тривимірному просторі, що допомагає зробити зображення більш чітким. Рис. 3.4 показує розгортку зображення Місяця. У процесі відновлення контрасту аналізуються довколишні пікселі, а також враховуються інші параметри, такі як глибина зображення, його структура і потім з їх допомогою функція розгортки визначає найкращий контраст для зображення [10].

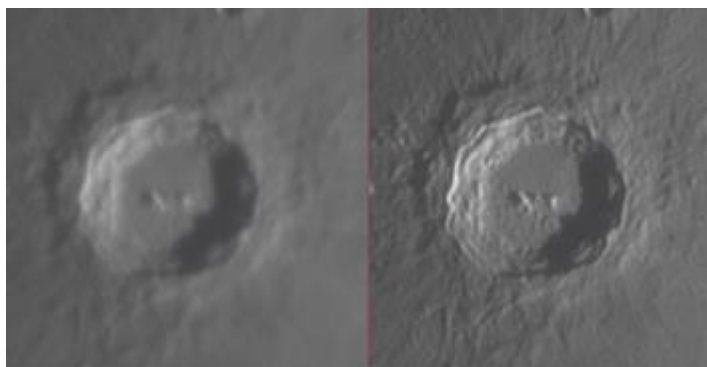


Рис.3.4 – Приклад розгортки зображення

3.4 Нейронні мережі для обробки зображень

Мозок або біологічну нейронну мережу розглядають як найбільш організовану систему, яка ефективно оброблює інформацію від різних органів

організму. Одним з ключових механізмів для обробки інформації у мозку є те, що складну інформацію обробляють шляхом взаємодії великої кількості структурно простих елементів. Цю взаємодію називають синапсом. В машинному навчанні штучні нейронні мережі представляють собою сімейство моделей, які структурно імітують нейронну систему людини [9].

3.4.1 Персептрон

Найбільш проста нейронна модель – персептрон, має вхідні параметри, вагові коефіцієнти для тренування та параметр зміщення.

Оскільки дана модель має один шар вихідного блоку, її найчастіше називають одношаровою нейронною мережею. Значення вихідного блоку є функцією активації, яка має зважену суму вхідних параметрів:

$$y(\mathbf{v}; \theta) = f\left(\sum_{i=1}^D v_i \omega_i + \omega_0\right) = f(\mathbf{w}^T \mathbf{v} + \omega_0), \quad (3.1)$$

де $\theta = \{\mathbf{w}, \omega_0\}$ – набір параметрів;

$\mathbf{w} = [\omega_i]_{i=1}^D \in \mathbb{R}^D$ – з'єднання вектору вагових коефіцієнтів:

ω_0 – зміщення.

Для багатокласової класифікації або регресії до персептрону додають вхідні параметри для кожного з класів з відповідними ваговими коефіцієнтами.

$$y_k(\mathbf{v}; \theta) = f\left(\sum_{i=1}^D v_i W_{ki} + \omega_{k0}\right) = f(\mathbf{w}_k^T \mathbf{v} + \omega_0), \quad (3.2)$$

де $\theta = \{W \in \mathbb{R}^{K \times D}\}$;

W_{ki} — вагові коефіцієнти для класів з v_i до y_k .

В якості функції активації використовують софтмакс-функцію, в якій вихідні значення будуть означати вірогідність:

$$s(z_k) = \exp(z_k) / \sum_{i=1}^K \exp(z_i), \quad (3.2)$$

де z_k та z_i - значення до активації[9].

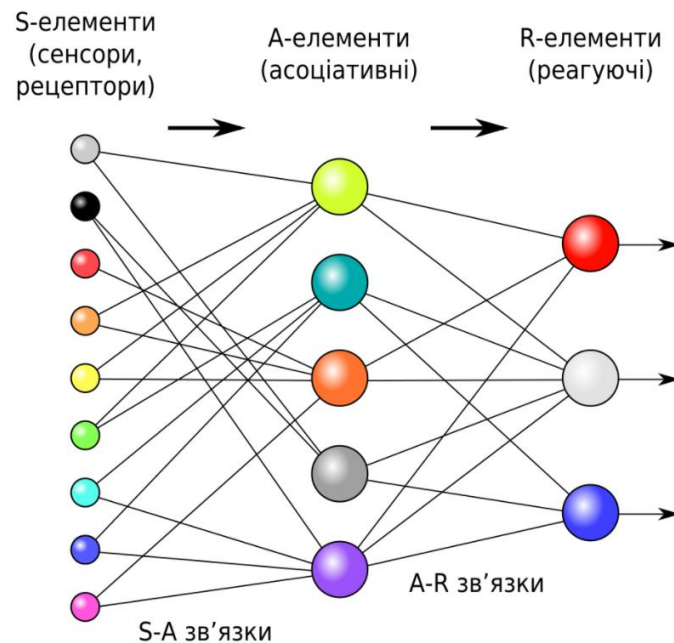


Рис. 3.5 – Логічна схема персептрону з 3 виходами [13]

3.4.2 Згорткові нейронні мережі

У багатошарових нейронних моделях вхідні дані завжди мають векторне представлення. Але для медичних зображень структурна або конфігураційна інформація сусідніх пікселів або вокселів є також важливою інформацією. Тому векторизація знищує таку інформацію на зображенні. Згорткова нейронна мережа зазвичай має проміжні шари, за якими знаходяться повністю зв'язані шари як і у випадку стандартної нейронної мережі. Це допомагає використовувати в якості вхідних параметрів двомірні та тримірні зображення. ЗНМ використовує розподіл вагових коефіцієнтів для зменшення часу на обрахунок [9].

3.4.2.1 Згортка та об'єднуючі шари.

Ціль згортки заключається у знаходженні локальних особливостей у різних точках зображень з ядер, які здатні навчатись, тобто вагові параметри зв'язку між ознаками на шарі $l-1$ та ознаками на шарі l . Наприклад, одиниці шару згортки l розраховують своє значення функції активації лише на основі просторово суміжного піднабору значень ознак попереднього шару за формулою:

$$A_j^{(l)} = f \left(\sum_{i=1}^{M^{(l-1)}} A_i^{(l-1)} * k_{ij}^{(l)} + b_j^{(l)} \right), \quad (3.3)$$

де $M^{(l-1)}$ — кількість об'єктів в шарі $l-1$;

* оператор згортки;

$b_j^{(l)}$ — параметр зміщення;

f – нелінійна функція активації.

Завдяки локальній зв'язності і розподілу вагових коефіцієнтів можна значно зменшити кількість параметрів у порівнянні з повністю підключеною нейронною мережею, і таким чином можна уникнути перенавчання. Крім того, коли вхідне зображення зміщується, активація одиниць виміру у картах об'єктів також зміщується на ту ж величину, що дозволяє нейронній мережі працювати з еквіваріантно малим зрушенням, як показано на рис 3.6. На малюнку, коли значення пікселів у вхідному зображенні зсуваються на один піксель вправо і на один піксель вниз, вихідні дані після згортки також зсуваються на один піксель вправо і на один піксель вниз.

Шар об'єднання слідує за шаром згортки, щоб зменшити кількість карт об'єктів попереднього шару згортки. Зокрема, кожна карта об'єктів у шарі об'єднання пов'язана з картою об'єктів в шарі згортки, і кожна одиниця в карті об'єктів шару об'єднання обчислюється на основі підмножини одиниць в його сприйнятливому полі. Подібне до шару згортки рецептивне поле, яке знаходить максимальне значення серед одиниць у своєму рецептивному полі, згортається з картою згортки, але з кроком розміру рецептивного поля, так що суміжні рецептивні поля зазвичай не перекриваються. Роль об'єднуючого шару полягає в поступовому зменшенні просторового розміру карт об'єктів і, таким чином, зменшенні числа параметрів і обчислень, задіяних у мережі. Ще одна важлива функція шару об'єднання - це перерахунок інваріантності по відношенню до малих просторових зрушень на вході. На рис. 3.6, в той час як найнижче ліве зображення є зсунутою версією верхнього лівого зображення на один піксель вправо і на один піксель вниз, їх виходи після операцій згортки і об'єднання однакові, особливо для одиниць вимірювання зеленого кольору [9].



Рисунок 3.6 – Схематичне зображення згорткової нейронної мережі

3.4.2.2 Застосування повністю згорткових мереж у медицині

Згорткові нейронні мережі - це ієрархічні моделі, що володіють величезною репрезентативною здатністю і успішно застосовуються для вирішення завдань комп'ютерного зору, включаючи локалізацію об'єктів, класифікацію. Було показано, що конкретний приклад моделей ЗНМ, відомих як повністю згорткова мережа (ПЗМ), забезпечує підвищену обчислювальну ефективність навчання за допомогою простої параметризації моделі і просторової узгодженості витягнутих об'єктів. Експериментальні результати показують, що моделі ПЗМ можуть значно перевершувати традиційні підходи, засновані на навчанні, при досягненні продуктивності в реальний час. Модель ПЗМ також може бути використана в задачі локалізації органів без необхідності додаткових тренувальних даних [9].

3.4.3 Розрахунок градієнту у нейронних мережах

Якщо зробити припущення, що за шаром згортки йде об'єднуючий шар, то в такому випадку у карті об'єктів шару згортки 1 поєднуються з одиницею

відповідної карти об'єктів у об'єднуючому шарі $l+1$. При збільшенні вибірки карт об'єктів об'єднуючого шару для відновлення зменшеного розміру карт все, що потрібно зробити це помножити похідну функції активації наступним чином:

$$\Delta_j^{(l)} = f'(\mathbf{z}_j^{(l)}) \odot up(\Delta_j^{(l+1)}), \quad (3.4)$$

де \odot — означає операцію масштабування;

l — шар мережі;

$\mathbf{z}_j^{(l)}$ — згортковий шар преактивації.

Для випадку, коли за поточним шаром слідує шар згортки, потрібно з'ясувати, яке місце на карті об'єктів поточного шару відповідає одиниці на карті об'єктів наступного шару. Вагові ядра, які перемножують зв'язки між вхідним патчем і вихідним блоком, є точними вагами згорткового ядра. Градієнти для вагових ядер обчислюються за ланцюговим правилом, аналогічним зворотному поширенню. Однак, оскільки тепер ті ж вагові коефіцієнти розподіляються між багатьма сполуками, потрібно потрібно підсумувати градієнти для даної ваги по всіх з'єднаннях, використовуючи ваги ядра наступним чином:

$$\frac{\partial E}{\partial k_{ij}^{(l)}} = \sum_{u,v} \Delta_{j;(u,v)}^{(j)} \mathbf{p}_{i;(u,v)}^{(l-1)}, \quad (3.5)$$

де $\mathbf{p}_{i;(u,v)}^{(l-1)}$ — область у i -ознаці об'єктів карти шару $l-1$ [9].

3.4.4 Моделі глибокого навчання

При невеликому допущенні про функцію активації двошарова нейронна мережа з кінцевим числом прихованих одиниць може апроксимувати будь-яку безперервну функцію. Таким чином, таку нейронну мережу можна розглядати як універсальний апроксиматор. Однак, апроксимувати складні функції можливо з тією ж точністю, використовуючи "глибоку" архітектуру (тобто кілька шарів) з набагато меншою кількістю нейронів в цілому. Отже, можна зменшити кількість вагових параметрів, що дозволить мережі тренуватись на відносно невеликому наборі даних.

Що ще важливіше, в порівнянні з неглибокою архітектурою, яка потребує хорошого екстрактора ознак, глибокі моделі хороші для автоматичного виявлення хороших ознак ієрархічним способом, тобто від детального до загального [9].

3.4.4.1 Проблема «зникаючого градієнту»

Хоча раніше вже робилися спроби розгортання глибоких нейронних мереж, відсутність навчальних вибірок і обмежена обчислювальна потужність не дозволяли успішно використовувати їх в прикладних цілях. Останнім часом завдяки величезному обсягу даних, доступних в Інтернеті, і досягненням в області апаратного забезпечення, такого як багатоядерні центральні процесори і графічні процесори, ці труднощі були вирішені. Однак проблема так званого "зникаючого градієнта" залишилася однією з головних труднощів в навчанні. Тобто для глибокої мережі зворотні повідомлення про помилках стають неефективними через зникаючі градієнти після багаторазового множення. У зв'язку з цим, градієнти, як правило, зменшуються, оскільки вони поширюються назад через приховані шари і

елементи в нижніх шарах (близько до вхідного шару) навчаються набагато повільніше, ніж одиниці у верхніх шарах (близько до вихідного шару).

Що стосується зникаючого градієнта, то було з'ясовано, що логістична сигмовидна функція активації приводила до того, що похідні одиниць по ваговим параметрам зв'язку наближались до 0 на початку навчання і, отже, істотно сповільнювали швидкість навчання. В якості потенційного вирішення цієї проблеми було запропоновано альтернативні функції активації, такі як гіперболічна дотична функція і функція м'якого знаку зі способами ініціалізації вагових коефіцієнтів. Тим часом було розроблено пошарову техніку попереднього навчання, яка зробила прорив для розв'язку проблеми зникаючого градієнта. З точки зору навчання, у звичайному мережевому навчанні випадковим чином ініціалізуються вагові коефіцієнти з'єднань, а потім спільно вивчають всі вагові параметри за допомогою методів градієнтного спуску разом з алгоритмом зворотного поширення для обчислення градієнтів контрольованим чином. Ідея попереднього навчання полягає в тому, що замість того, щоб безпосередньо регулювати всі вагові параметри з випадкових початкових значень, корисно спочатку навчити ваги з'єднань прихованих шарів неконтрольованим і пошаровим способом, а потім спільно налаштувати ваги з'єднань. Ця техніка використовується в штабельованому автоенкодері [9].

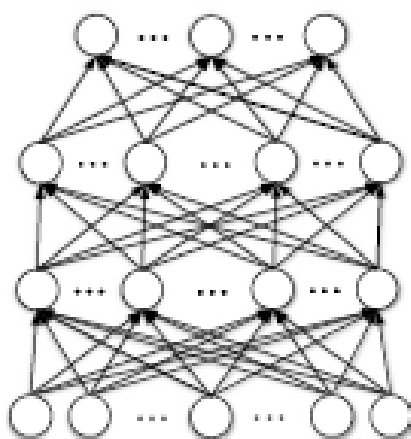


Рисунок 3.7 – Штабельований автоенкодер

3.4.4.2 Автоенкодер

Автоенкодер являє собою особливий тип двошарової нейронної мережі, що складається з вхідного шару, прихованого шару і вихідного шару. Вхідний шар повністю з'єднаний з прихованим шаром, який, в свою чергу, повністю з'єднаний з вихідним шаром.

Мета автоенкодера – дізнатися спосіб представлення вхідних даних, мінімізуючи помилку відновлення між вхідними даними та відновленими значеннями з вивченого представлення.

Нехай D_H та D_I означають число прихованих одиниць та число вхідних одиниць нейронної мережі. Для вхідного сигналу $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^{D_I}$ автоенкодер перетворює його у приховане представлення $\mathbf{a} \in \mathbb{R}^{D_H}$ за допомогою лінійного відображення, а потім виконують нелінійне перетворення з нелінійною функцією активації наступним чином:

$$\mathbf{a} = f(\mathbf{W}^{(1)}\mathbf{x} + \mathbf{b}^{(1)}), \quad (3.6)$$

де $\mathbf{W}^{(1)} \in \mathbb{R}^{D_H \times D_I}$ – кодуєча вагова матриця;

$\mathbf{b}^{(1)} \in \mathbb{R}^{D_H}$ – вектор зміщення.

Представлення \mathbf{a} прихованого шару зіставляється назад з вектором $\mathbf{y} \in \mathbb{R}^{D_I}$, що приблизно відновлює вхідний вектор \mathbf{x} за допомогою іншого відображення наступним чином:

$$\mathbf{y} = \mathbf{W}^{(2)}\mathbf{a} + \mathbf{b}^{(2)} \approx \mathbf{x}, \quad (3.7)$$

де $\mathbf{W}^{(2)} \in \mathbb{R}^{D_H \times D_I}$ – декодуєча вагова матриця;

$\mathbf{b}^{(2)} \in \mathbb{R}^{D_H}$ – вектор зміщення.

Структурно число вхідних та вихідних одиниць визначаються розмірністю вагового вектору. Тим часом, кількість прихованих одиниць може бути визначена на основі характеру даних. Якщо кількість прихованих одиниць менше розмірності вхідних даних, то для зменшення розмірності можна використовувати автоенкодер. Однак варто зазначити, що для отримання складних нелінійних співвідношень між вхідними ознаками можна використати число прихованих одиниць, яке буде навіть більше, ніж розмір вхідних даних, наклавши обмеження розрідженості. З точки зору навчання, метою автокодера є мінімізація помилки відновлення між входом і виходом по відношенню до параметрів [9].

3.5 Висновки до розділу 3

У третьому розділі описано застосування методів комп'ютерної діагностики для обробки медичних зображень. Наведено методи обробки зображень, розглянуто принципи побудови нейронних мереж та способи застосування в якості інструменту аналізу медичних зображень.

4 РОЗРОБКА МЕТОДУ АНАЛІЗУ СТАДІЙ РОЗВИТКУ КАРДІОМІОЦИТІВ

4.1 Попередня обробка зображень

Швидкий та точний аналіз медичних зображень відіграє важливу роль у сучасній медицині. Через збільшення кількості методів досліджень та баз даних важливою стає автоматизація процесу обробки та аналізу зображень. Підвищення ефективності алгоритмів правильно аналізувати зображення дасть змогу збільшити кількість корисної інформації.

Як відомо, серцево-судинні захворювання є найрозповсюдженішою причиною смерті людини.

В останні роки задля моделювання серцевих захворювань або спостереження за роботою серця після введення ліків використовують кардіоміоцити, які отримані зі стовбурових клітин. Однією з ознак стадій розвитку кардіоміоциту є кількість т-трубочок, які знаходяться у саркоплазматичній мембрані. Ці елементи кардіоміоцитів грають вирішальну роль у синхронному вивільненні іонів кальцію. Саме цей процес забезпечує синхронність скорочень серцевого м'язу, тому за допомогою аналізу т-трубочок у кардіоміоцитах є можливість діагностувати серцево-судинні захворювання, такі як шлуночкова аритмія [14].

Для дослідження було обрано базу даних зображень кардіоміоцитів, отриманих за допомогою конфокального мікроскопу [15]. Наявні зображення було розділено на 6 класів. Класи 1-5 відображають стадії розвитку серцевих клітин: від найменш розвиненого до звичайного кардіоміоциту. До класу 0 були віднесені зображення на яких відсутні зображення кардіоміоцитів або зображена лише невелика частина клітини.

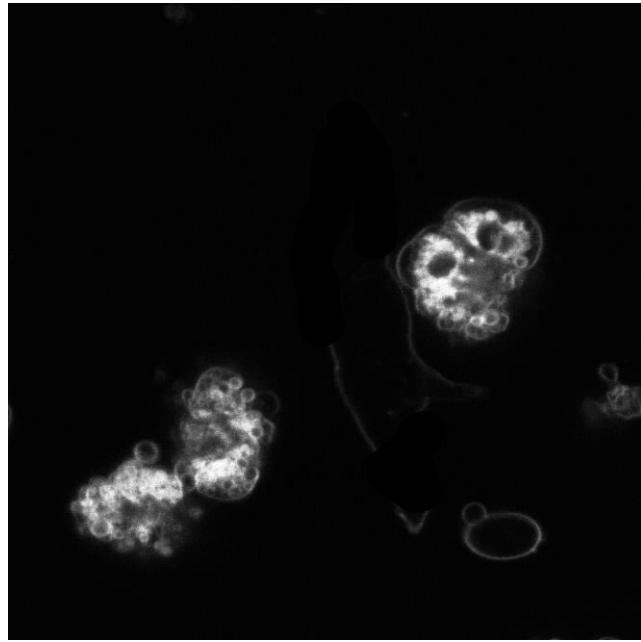


Рисунок 4.1 – Зображення з бази даних, клас 0 [15]



Рисунок 4.2 – Зображення кардіоміоциту, клас 1 [15]

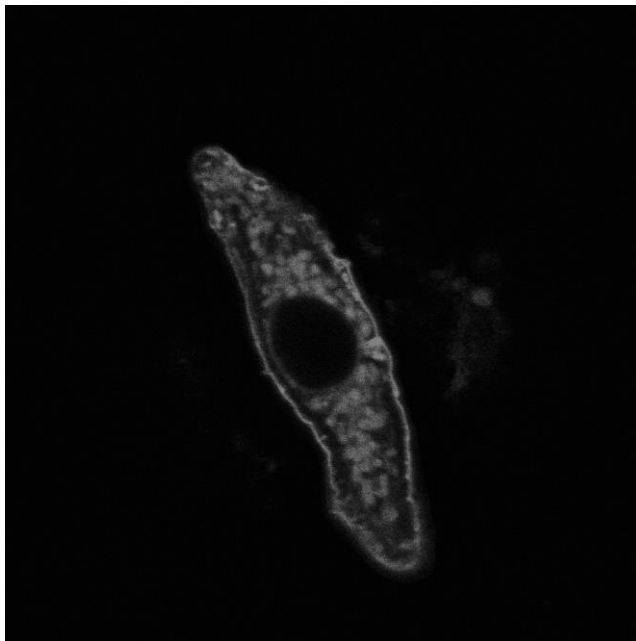


Рисунок 4.3 – Зображення кардіоміоциту, клас 2 [15]

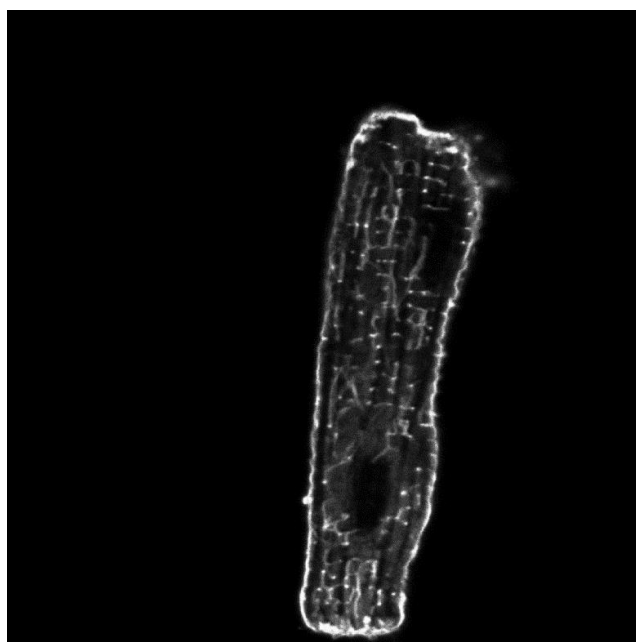


Рисунок 4.4 – Зображення кардіоміоциту, клас 3 [15]

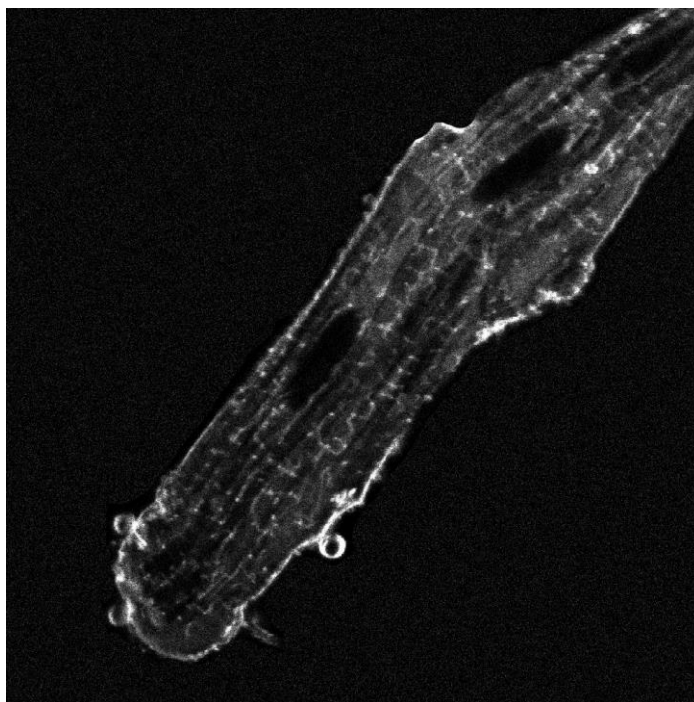


Рисунок 4.5 – Зображення кардіоміоциту, клас 4 [15]

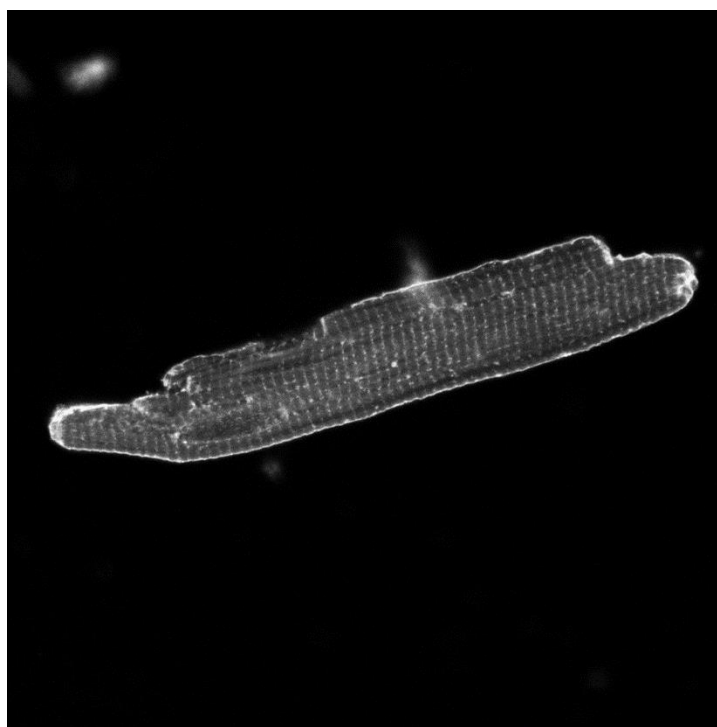


Рисунок 4.6 – Зображення кардіоміоциту, клас 5 [15]

В якості першого етапу обробки було виконано сегментацію зображень у середовищі «Матлаб».

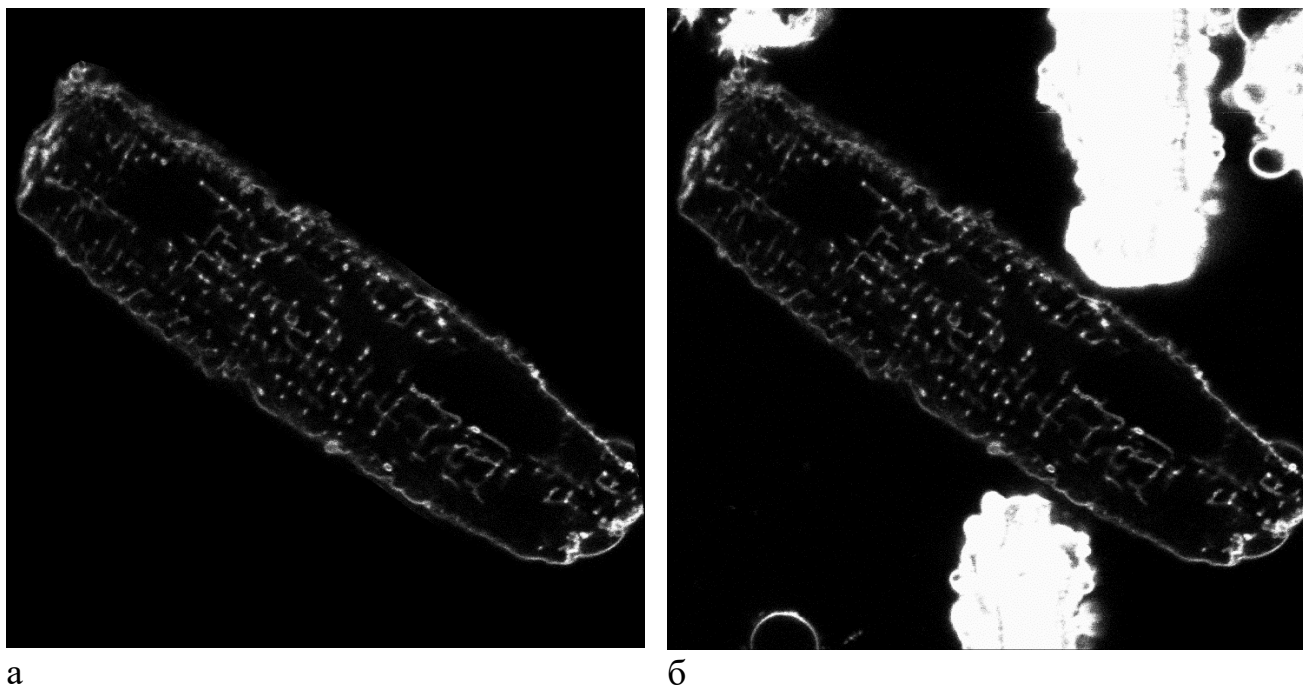


Рисунок 4.7 – Зображення кардіоміоциту з класу 1: а – після сегментації; б – до сегментації

Для збільшення кількості зображень у базі даних було проведено розширення (аугментацію) даних. Зображення було повернуто з кроком 15 градусів відносно вертикальної вісі. Дана операція дозволила збільшити кількість зображень у 24 рази.

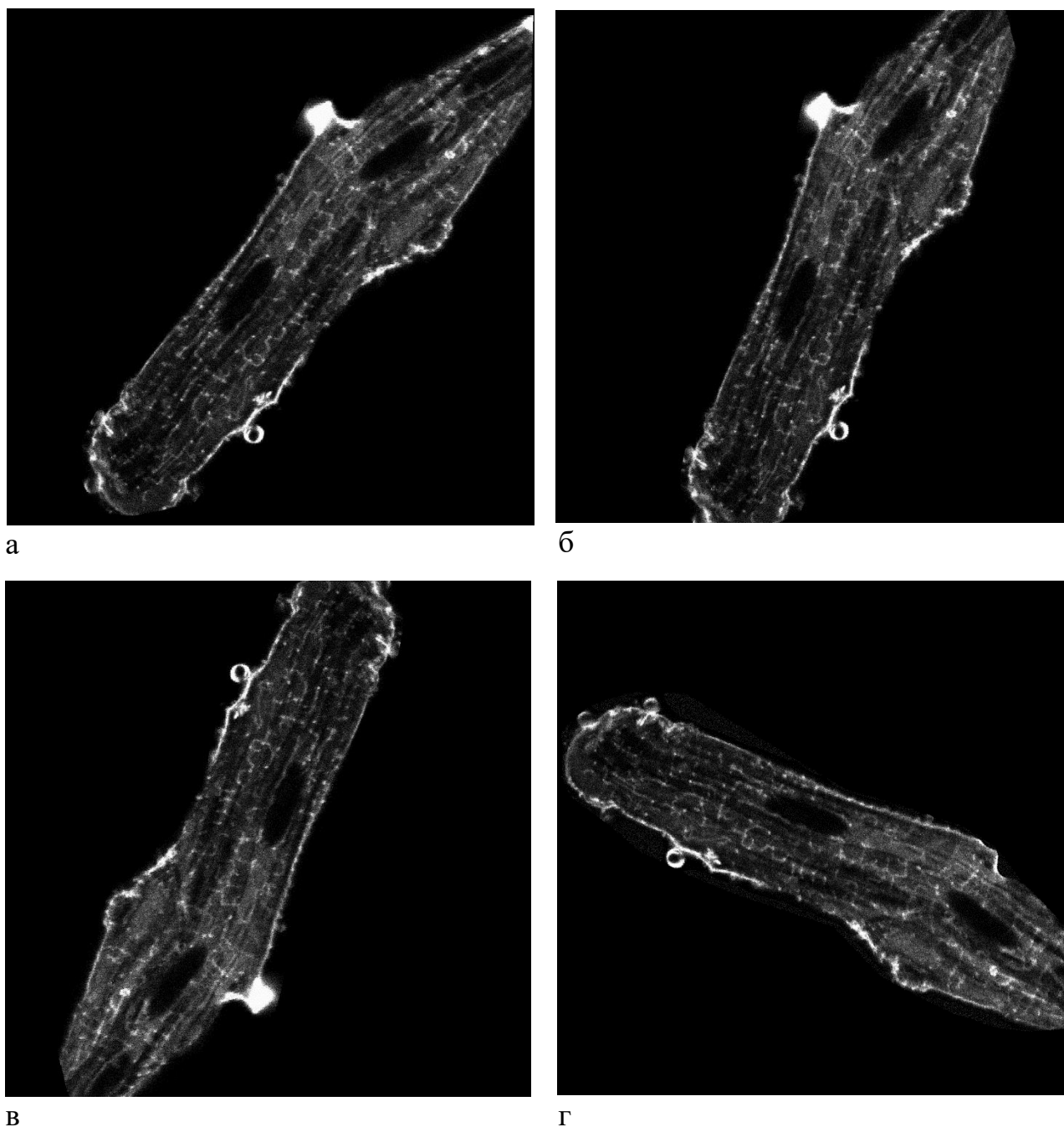


Рисунок 4.8 – Приклад розширення бази даних шляхом повороту зображення: а – вихідне, після сегментації; б – кут повороту 60 градусів; в – кут повороту 95 градусів; г – кут повороту 285 градусів.

Також було застосовано інверсію зображень вздовж вертикальної та горизонтальної вісі. Даний етап дозволив підвищити кількість зображень у 3 рази.

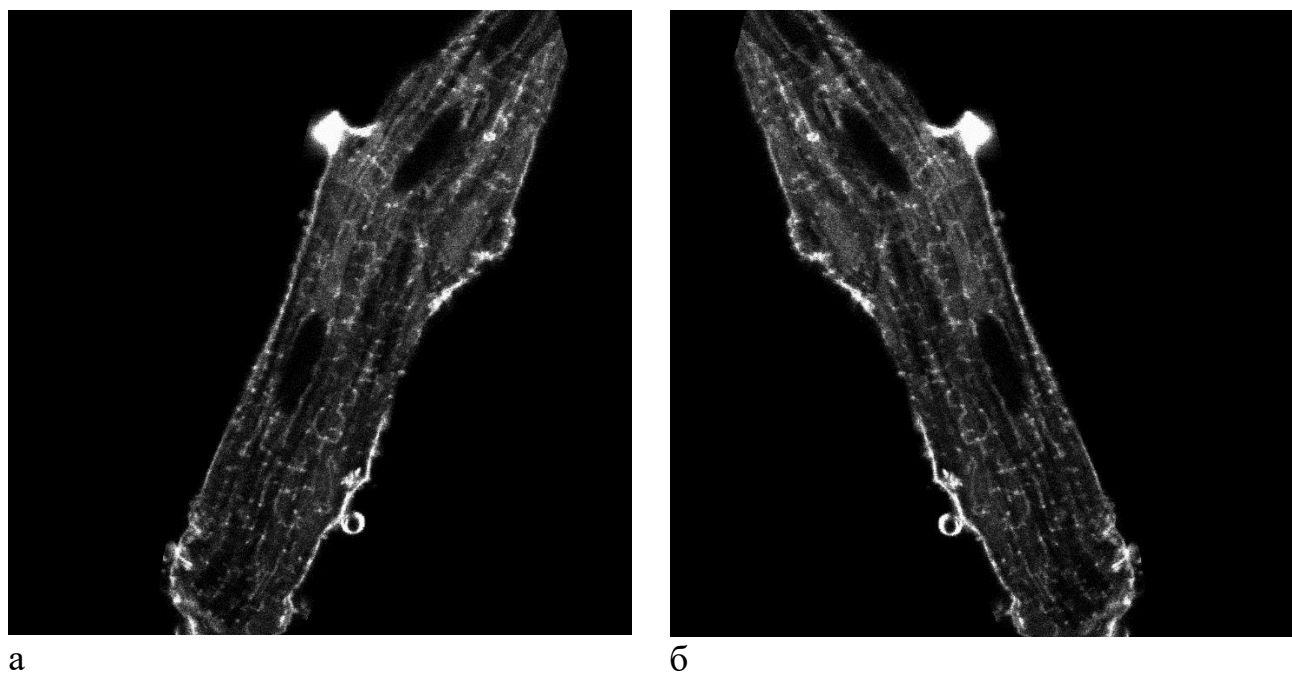


Рисунок 4.9 – Зображення кардіоміоциту: а – до інверсії; б – після вертикальної інверсії

Оскільки важливою ознакою для аналізу та класифікації етапів розвитку кардіоміоциту є розмір клітини та розмір т-трубочок, які знаходяться всередині, було проведено еквалізацію зображень, тобто підвищення контрасту зображення.

В результаті попередньої обробки зображень було збільшено базу даних з 288 зображень до 20700 для подальшої класифікації.

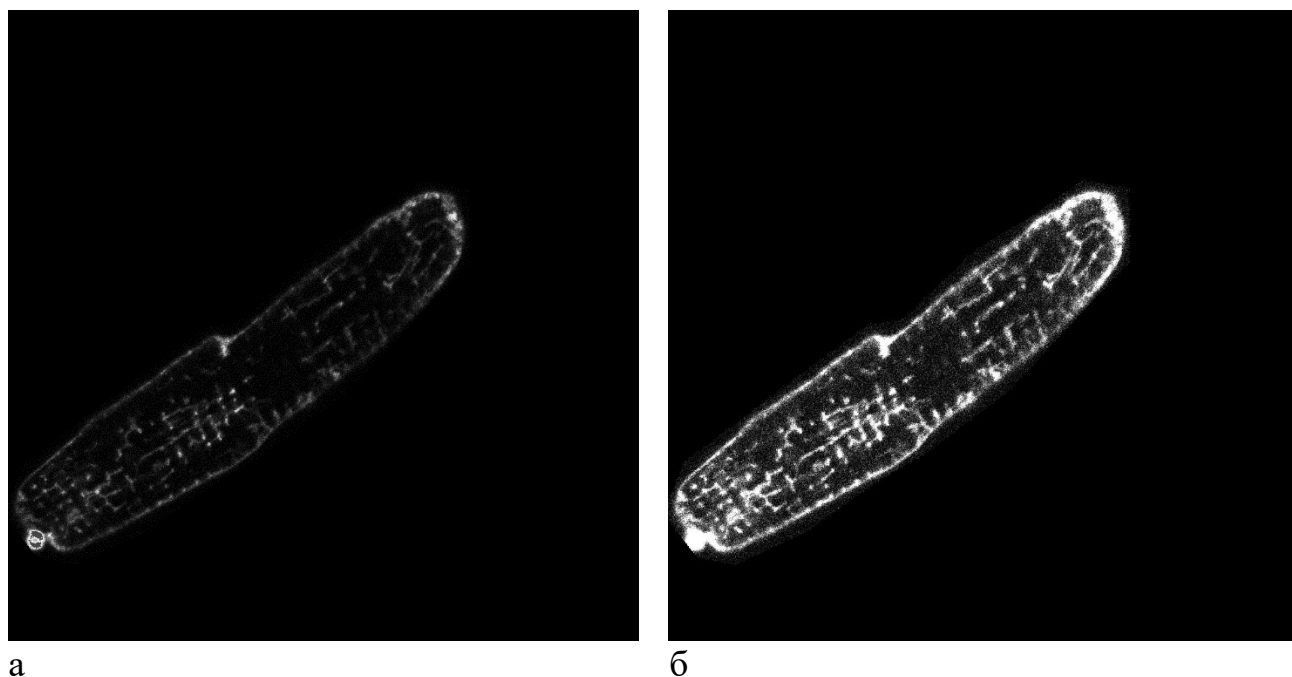


Рисунок 4.10 – Зображення кардіоміоциту: а – до еквалізації; б – після еквалізації зображення

4.2 Розроблення згорткової нейронної мережі

В якості алгоритму для класифікації зображень кардіоміоцитів було розроблено згорткову нейронну мережу (рис. 4.11). Дана нейронна мережа складається з 23 шарів. Нейронна мережа на рисинку 4.11 складається з вхідного шару, п'яти шарів згортки (conv_1-conv_5), п'яти шарів пакетної нормалізації (batchnorm_1-batchnorm_5), п'яти шарів випрямленої лінійної функції активації (relu_1-relu_5), 4 шарів підвибірки (maxpool_1-maxpool_4), повністю пов'язаного шару (fc), нормованої експоненційної функції (softmax) та вихідного шару класифікації (classoutput).

Для запобігання перенавчання алгоритму було застосовано перехресну валідацію. Для перехресної валідації розширену базу даних було розділено за наступним співвідношенням: 70 % зображень використовувались для тренування

нейронної мережі, 30 % - для перевірки точності розпізнавання. Мірою точності є відсоток правильно класифікованих зображень по наявним класам. На рисунку 4.12 зображено графік залежності точності класифікації від кількості виконаних ітерацій тренування згорткової нейронної мережі. На тренування нейронної мережі було витрачено 2 год 26 хв 53 с. В результаті було отримано алгоритм з точністю класифікації 85.59 %. Зважаючи на складну структуру кардіоміоцитів, а також високу варіативність можливих форм клітин на всіх етапах розвитку є всі підстави вважати, що алгоритм має високу точність класифікації зображень клітин серця.

Якщо проаналізувати результати класифікації по розмічених класах зображень, то клас 0 класифікувався з точністю 100 %. Зображення із класу 1 та 2 мають результат 50 %. Алгоритм помилково класифікував зображення із класу 1 до класу 2 та навпаки. Клас 3 має результат у 78 %, 22 % зображень з даного класу були класифіковані до 4 класу. 4 клас має точність класифікації 85 %, 15 % зображень були помилково віднесені до 3 класу. Для 5 класу точність класифікації 92 %, 2 % були класифіковані до класу 0, 6 % - до 4 класу.

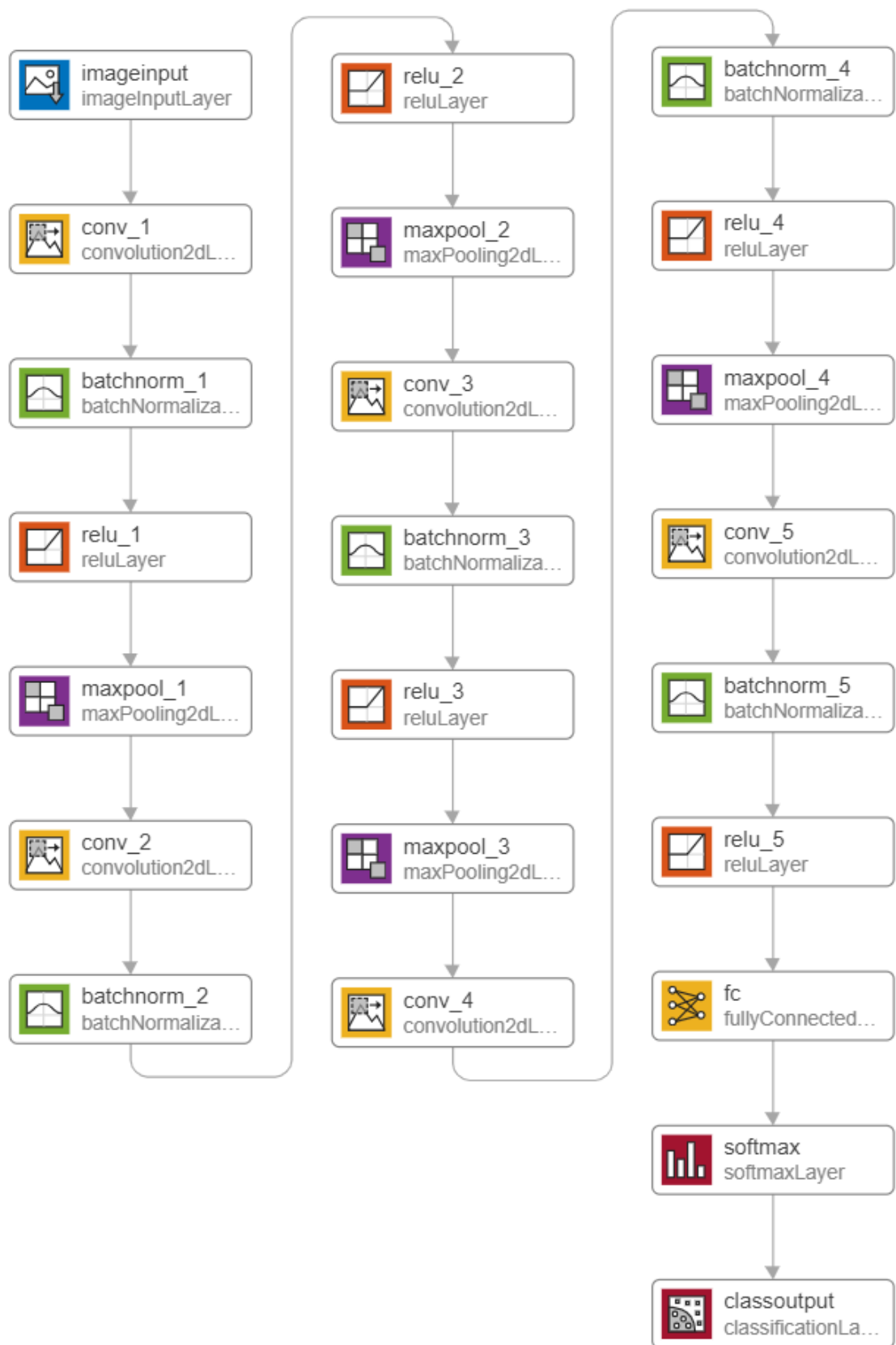
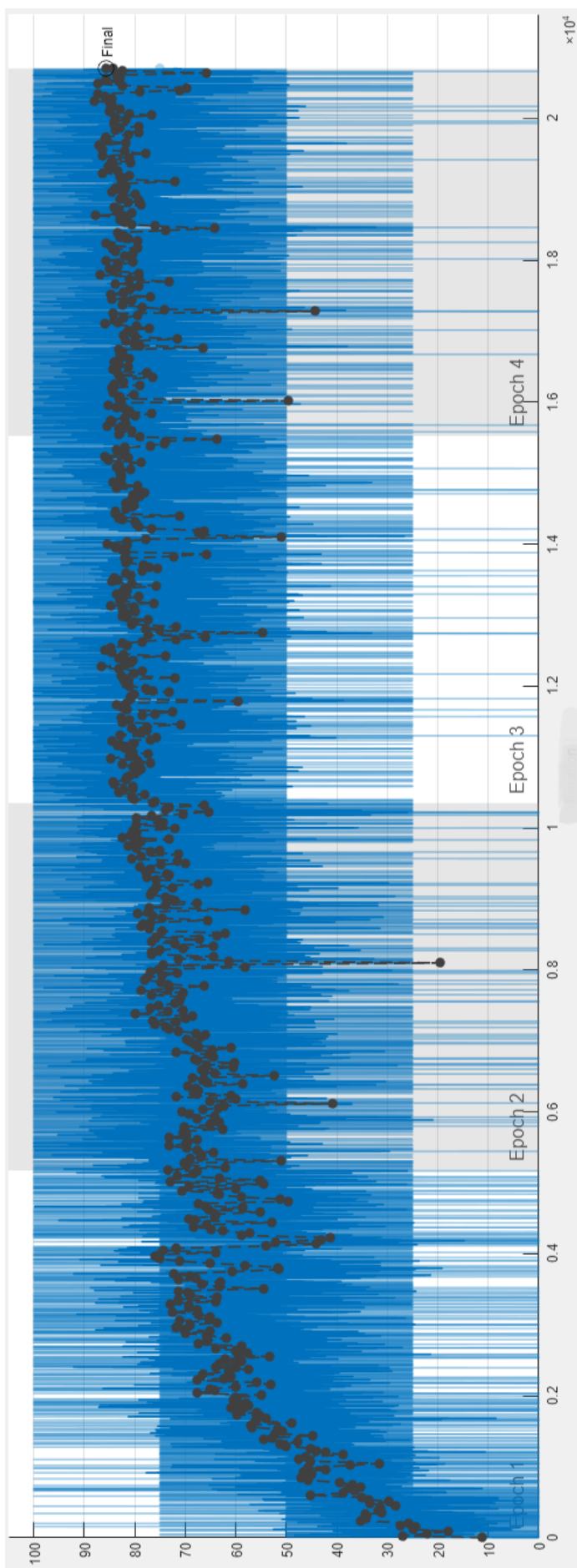


Рисунок 4.11 – Архітектура розробленої нейронної мережі



Синім кольором позначено точність тренування на кожній ітерації, чорним кольором позначено точність ЗНМ після перехресної валідації.

Рисунок 4.12 – Графік залежності точності класифікації від кількості ітерацій тренування нейронної мережі

4.3 Висновки до розділу 4

В даному розділі наведено опис розробки алгоритму розпізнавання та класифікації зображень кардіоміоцитів. Описано процес попередньої обробки даних та застосування нейронної мережі для завдання класифікації. Даний алгоритм дозволяє з високою точністю класифікувати клітини кардіоміоцитів.

Окрім цього, структура алгоритму дозволяє його використання не лише для кардіоміоцитів, а і для дослідження інших типів клітин, враховуючи, звичайно те, що нейронну мережу необхідно буде натренувати на потрібному наборі зображень.

Дана розробка дозволяє гнучко підходити до експериментів, в яких використовують зображення з флуоресцентними барвниками.

5 РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ

5.1 Опис ідеї проекту

Таблиця 5.1 – Опис ідеї стартап-проекту

Зміст ідеї	Напрямки застосування	Вигоди для користувача
Класифікація зображень кардіоміоцитів, отриманих за допомогою скануючого мікроскопу	1. Застосування у медицині	Простота використання
	2. Застосування у наукових центрах	Можливість налаштовувати алгоритм для окремих експериментів

Таблиця 5.2 – Визначення сильних, слабких та нейтральних характеристик ідеї проекту

№ п/п	Техніко-економічні характеристики ідеї	(потенційні) товари/концепції конкурентів				W (слабка сторона)	N (нейтральна сторона)	S (сильна сторона)
		Мій проект	Конкурент 1	Конкурент 2	Конкурент 3			
1	Економічна характеристика	Низька	Висока	Висока	Висока			+

Продовження таблиці 5.2

№ п/п	Техніко- економіч ні характер истики ідеї	(потенційні) товари/концепції конкурентів				W (слабка сторона)	N (нейтральна сторона)	S (сильна сторона)
		Мій проект	Конкуре нт 1	Конкуре нт 2	Конкурен т 3			
2	Технолог ічна характер истика	Здатність до швидкої класифікації, здатність до переналашт ування для використан ня у інших експеримен тах	Здатність до швидкої класифі кації, неможл ивість перенал аштуван ня	Здатність до повільно ї класифі кації, неможл ивість перенал аштуван ня	Здатність до повільної класифіка ції, здатність до перенала штування для використ ання у інших експерим ентах			+
3	Надійніс ть	Висока довговічніс ть	Висока довговіч ність	Висока довговіч ність	Висока довговічн ість		+	

5.2 Технологічний аудит проекту

Таблиця 5.3 – Технологічна здійсненність ідеї проекту

№ п/п	Ідея проекту	Технології та її реалізації	Наявність технологій	Доступність технологій
1	Класифікація зображень кардіоміоцитів, отриманих за допомогою скануючого мікроскопу	Реалізація класифікації у середовищі «Матлаб»	Наявна	Доступна, необхідне використання ліцензійної версії «Матлаб» або тимчасової ліцензійної версії «Матлаб»
2		Отримання зображень за допомогою лазерного скануючого мікроскопу	Наявна	Важкодоступна, необхідне використання лазерного скануючого мікроскопу
Обрана технологія реалізації проекту: реалізація проекту у середовищі «Матлаб».				

5.3 Аналіз ринкових можливостей запуску стартап-проекту

Таблиця 5.4 – Попередня характеристика потенційного ринку стартап-проекту

№ п/п	Показники стану ринку (найменування)	Характеристика
1	Кількість головних гравців, од	3
2	Загальний обсяг продаж, грн/ум. од	30
3	Динаміка ринку (якісна оцінка)	Зростає
4	Наявність обмежень для входу (вказати характер обмежень)	Відсутні
5	Специфічні вимоги до стандартизації та сертифікації	Відсутні
6	Середня норма рентабельності в галузі (або по ринку), %	65 %

Зважаючи на показник норми рентабельності у 65 %, ринок вважається привабливим.

Таблиця 5.5 - Характеристика потенційних клієнтів стартап-проекту

№ п/п	Потреба, що формує ринок	Цільова аудиторія (цільові сегменти ринку)	Відмінності у поведінці різних потенційних цільових груп клієнтів	Вимоги споживачів до товару
1	Швидка та точна класифікація зображень клітин	Наукові центри та медичні заклади	Відсутня	Низька вартість Зручність Довговічність

Таблиця 5.6 - Фактори загроз

№ п/п	Фактор	Зміст загрози	Можлива реакція компанії
1	Відсутність кваліфікованих працівників	Для додаткового налаштування або переналаштування алгоритму необхідні працівники з досвідом роботи у середовищі «Матлаб».	Проходження стажувань та курсів, доступних на офіційному сайті «Матлабу» або на освітніх платформах.
2	Конкуренція	Достатнє число аналогів, які можуть використовуватись без необхідності застосування середовища «Матлаб».	Створення графічного інтерфейсу програми для зменшення складності використання програми.

Таблиця 5.7 - Фактори можливостей

№ п/п	Фактор	Зміст можливостей	Можлива реакція компанії
1	Використання нейронних мереж	Нейронні мережі – алгоритми, які швидко розвиваються та демонструють високі результати при роботі зі зображеннями	Широке застосування подібних алгоритмів у суміжних задачах

Продовження таблиці 5.7

№ п/п	Фактор	Зміст можливостей	Можлива реакція компанії
2	Застосування у наукових центрах	Можливість отримання швидкого оберненого зв'язку та подальшого покращення продукту	Тісна співпраця між розробниками та науковим центром

Таблиця 5.8 - Ступеневий аналіз конкуренції на ринку

Особливості конкурентного середовища	В чому проявляється дана характеристика	Вплив на діяльність підприємства (можливі дії компанії, щоб бути конкурентоспроможною)
1.Вказати тип конкуренції: олігополія.	Мала кількість фірм, яка займається розробкою алгоритмів для досліджень.	Збільшення кількості налаштувань для підвищення якості алгоритму.
2. За рівнем конкурентної боротьби – міжнародний рівень.	Дослідження не мають обмежень за країнами.	Випуск документації основними мовами світу.
3. За галузевою ознакою - внутрішньогалузева.	Конкуренція між компаніями, які випускають однотипні продукти.	Зменшення ціни.
4. Конкуренція за видами товарів: товарно-родова.	Компанії займаються одним типом досліджень з використанням різних технологій.	Покращення якості товару.

Продовження таблиці 5.8

Особливості конкурентного середовища	В чому проявляється дана характеристика	Вплив на діяльність підприємства (можливі дії компанії, щоб бути конкурентоспроможною)
5. За характером конкурентних переваг – цінова.	Невелика ціна за якісний продукт.	Підвищення якості та зменшення ціни на продукт.
6. За інтенсивністю - не марочна.	Між брендами не має боротьби.	Не має значення назва бренду.

Таблиця 5.9 - Аналіз конкуренції в галузі за М. Портером

Складові аналізу	Прямі конкуренти в галузі	Потенційні конкуренти	Постачальники	Клієнти	Товари-замінники
	ISS, Sensofar Metrology Andor Technology.	Відсутні.	Фактором сили є кількість постачальників.	Фактори сили клієнтів: якість, ціна.	Немає.
Висновки:	Висока кількість конкурентів, але важливим є пристосування до будь-яких виробників скануючих мікроскопів.	Відсутні.	Постачальники не диктують умови.	Умови клієнтів: якість, ціна.	Немає перешкод.

Висновок: потрібно адаптувати продукт для взаємодії з всіма виробниками скануючих мікроскопів, що дозволить закріпитись на ринку.

Таблиця 5.10 – Обґрунтування факторів конкурентоспроможності :

№ п/п	Фактор конкурентоспроможності	Обґрунтування (наведення чинників, що роблять фактор для порівняння конкурентних проектів значущим)
1	Ціна	У продукту нижча ціна ніж у конкурентів.
2	Якість	Результати розпізнавання становлять близько 86 %.
4	Інноваційність	Застосування технологій штучного інтелекту.

Таблиця 5.11 – SWOT-аналіз стартап-проекту

Сильні сторони: Інноваційність, ціна.	Слабкі сторони: невелика відомість продукту.
Можливості: адаптація до застосування нових методів штучного інтелекту для аналізу зображень.	Загрози: Через наявність більш відомих конкурентів існує складність у розповсюдженні товару.

Таблиця 5.12 – Альтернативи ринкового впровадження стартап-проекту

№ п/п	Альтернатива (орієнтовний комплекс заходів) поведінки. ринкової	Ймовірність отримання ресурсів	Строки реалізації
1	Розробка стажувань для майбутніх користувачів продукту.	70 %	5 місяців

Продовження таблиці 5.12

№ п/п	Альтернатива (орієнтовний комплекс заходів) ринкової поведінки.	Ймовірність отримання ресурсів	Строки реалізації
2	Залучення наукових центрів до співпраці.	85 %	1 рік

З таблиці 5.12 було обрано пункт 2, адже незважаючи на більшу тривалість, в майбутньому буде легше залучати нові центри до співпраці.

5.4 Розробка ринкової стратегії проекту

Таблиця 5.13 – Вибір цільових груп потенційних споживачів

№ п/п	Опис профілю цільової групи потенційних клієнтів	Готовність споживачів сприйняти продукт	Орієнтовний попит в межах цільової групи (сегменту)	Інтенсивність конкуренції в сегменті	Простота входу у сегмент
1	Медичні заклади	+	Невисокий	Низька	Висока
2	Наукові центри	+	Високий	Низька	Висока
Які цільові групи обрано: 2 група.					

Таблиця 5.14 – Визначення базової стратегії розвитку

№ п/п	Обрана альтернатива розвитку проекту	Стратегія охоплення ринку	Ключові конкурентоспроможні позиції відповідно до обраної альтернативи	Базова стратегія розвитку
1.	Співпраця з науковими центрами.	Пряма взаємодія з науковими центрами.	Низька ціна, інноваційність.	Стратегія спеціалізації.

Таблиця 5.15 – Визначення базової стратегії конкурентної поведінки

№ п/п	Чи є проект «першопрохідцем» на ринку?	Чи буде компанія шукати нових споживачів, або забирати існуючих у конкурентів?	Чи буде компанія копіювати основні характеристики товару конкурента, і які?	Стратегія конкурентної поведінки
1	Так.	Так.	Ні.	Стратегія виклику лідера.

Таблиця 5.16 - Визначення стратегії позиціонування

№ п/п	Вимоги до товару цільової аудиторії	Базова стратегія розвитку	Ключові конкурентоспроможні позиції власного стартап-проекту	Вибір асоціацій, які мають сформувати комплексну позицію власного проекту (три ключових)
1	Ціна	Стратегія диференціації	Зменшення ціни	Невелика ціна, висока інноваційність.
2	Інноваційність	Стратегія спеціалізації	Адаптація до нових методів класифікації зображень	

5.5 Розробка маркетингової програми проекту

Таблиця 5.17 – Визначення ключових переваг концепції потенційного товару

№ п/п	Потреба	Вигода, яку пропонує товар	Ключові переваги перед конкурентами (існуючі або такі, що потрібно створити)
1	Аналіз великого об'єму зображень	Висока швидкість аналізу та класифікації зображень	Низька ціна, висока інноваційність.

Таблиця 5.18 – Опис трьох рівнів моделі товару

Рівні товару	Сутність та складові		
I. Товар за задумом	Алгоритм класифікації зображень.		
II. Товар у реальному виконанні	Властивості/характеристики	М/Нм	Вр/Тх/Тл/Е/Ор
	1. Ціна	М	Е
	2. Інноваційність	Нм	Тх/Тл
	Якість: довговічність, можливість перевірки роботи.		
	Пакування: -		
	Марка: назва компанії та модель товару.		
III. Товар із підкріпленням	До продажу: документація з використання.		
	Після продажу: технічна підтримка		
За рахунок чого потенційний товар буде захищено від копіювання: авторське право			

Таблиця 5.19 - Визначення меж встановлення ціни

№ п/п	Рівень цін на товари-замінники	Рівень цін на товари-аналоги	Рівень доходів цільової групи споживачів	Верхня та нижня межі встановлення ціни на товар/послугу
1	Вищий	-	Середній	15-40\$

Таблиця 5.20 - Формування систем збуту

№ п/п	Специфіка закупівельної поведінки цільових клієнтів	Функції збуту, які має виконувати постачальник товару	Глибина каналу збуту	Оптимальна система збуту
1	Залежність від необхідності у медичних закладах та наявності скануючих мікроскопів у наукових центрах.	Пошук нових клієнтів, підтримка та аналіз зворотнього зв'язку від вже існуючих клієнтів.	Канал нульового рівня	Збут особисто компанією- розробником

Таблиця 5.21 – Концепція маркетингових комунікацій

№ п/п	Специфіка поведінки цільових клієнтів	Канали комунікацій, якими користуються цільові клієнти	Ключові позиції, обрані для позиціонування	Завдання рекламного повідомлення	Концепція рекламного звернення
1	Обрання товару залежно від функціональності та універсальності застосування	Прямий канал спілкування між компанією-розробником та клієнтами	Ціна, інноваційність	Зацікавити клієнта низькою вартістю та високими отриманими результатами	Наголошення на інноваційності та використанні алгоритмів штучного інтелекту

5.6 Висновки до розділу 5

В п'ятому розділі описано стратегії та позиціонування розробленого продукту. Також наведено основні переваги та недоліки, проведено порівняння з конкурентами. Зростання об'єму даних збільшує необхідність у швидких та точних алгоритмах обробки зображень, що в свою чергу підвищує перспективи спроектованого алгоритму, оскільки його основними перевагами є інноваційність та невисока вартість.

ВИСНОВКИ

В даній магістерській дисертації було описано електро-фізіологічну будову кардіоміоцитів, проведено порівняння з іншими типами м'язових клітин. Окрім цього було наведено принципи роботи лазерних скануючих мікроскопів, зокрема детально описано особливості конфокального мікроскопу. Також у дисертації наявний опис застосування комп'ютерної діагностики для аналізу медичних зображень. Наведено приклади базової обробки зображень. В якості нових способів обробки зображень описано нейронні мережі. У дисертації детально описано розробку алгоритму машинного навчання для класифікації стадій розвитку кардіоміоцитів, який заснований на згортковій нейронній мережі. В якості вихідних даних було обрано базу даних зображень кардіоміоцитів, отриманих за допомогою конфокального мікроскопу. Для збільшення кількості зображень було зроблено попередню обробку зображень, що дозволило збільшити кількість зображень у 72 рази. В якості алгоритму класифікації було розроблено згорткову нейронну мережу. Отримані результати після проведення тренування алгоритму та подальшої перевірки на тестовому наборі зображень показали точність класифікації у 85.59 %. Отриманий результат, зважаючи на високу варіабельність форми клітин показує високу ефективність розпізнавання. Окрім цього, даний алгоритм можливо використовувати не лише для зображень клітин кардіоміоцитів, а і для будь-яких інших зображень, отриманих за допомогою скануючих лазерних мікроскопів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Нормальная физиология человека / Б. И. Ткаченко. — 2-е изд. — М.: Медицина, 2005. — 928 с.
2. Гайтон А. К., Холл Д. Э. Медицинская физиология / В.И. Кобрина. — М.: Логосфера, 2008.— 1296 с.
3. Быков В. Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека: учебник для студентов медицинских институтов. / В. Л. Быков. — СПб. : Издательство «Сотис», 2002. — 237 с.
4. Іванушкіна Н. Г., Іванько К. О., Прокопенко Ю. В. Прикладна біофізика. Біоелектричні процеси. Конспект лекцій для студентів спеціальності 8.05080102 – фізична та біомедична електроніка. / Н. Г. Іванушкіна, К. О. Іванько, Ю. В. Прокопенко. – К., 2016. – 115 с.
5. Cox G. Optical Imaging Techniques in Cell Biology / G. Cox – Taylor & Francis Group, FL, USA – Taylor & Francis Group Boca Raton 2007. – 304 p. – ISBN 0-8493-3919-7.
6. Fujimoto James G., Farkas Daniel L. Biomedical optical imaging / James G. Fujimoto, Daniel L. Farkas – Oxford University Press, NY, USA : Oxford University Press Inc. 2009 – 422 p. – ISBN 978-0-19-515044-5.
7. Matsumoto B. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, Second Edition. Methods in Cell Biology. / B. Matsumoto – Academic Press, CA, USA : Academic Press 2002. – 507 p. – ISBN 0-12-580445-8.
8. Lu L., Zheng Y., Carneiro G., Yang L. Deep Learning and Convolutional Neural Networks for Medical Image Computing / L. Lu, Y. Zheng, G. Carneiro, L. Yang – Springer International Publishing, Switzerland : Springer 2017. – 326 p. – ISBN 978-3-319-42999-1.

9. Zhou Kevin S., Greenspan H., Shen D. Deep Learning for Medical Image Analysis / Kevin S. Zhou, H. Greenspan, D. Shen – Academic Press, London, United Kingdom: Elsevier Inc. 2017. – 433 p. – ISBN 978-0-12-810408-8.
10. Singh H. Practical Machine Learning and Image Processing For Facial Recognition, Object Detection, and Pattern Recognition Using Python / H. Singh – Apress, Allahabad, Uttar Pradesh, India : Apress 2019. – 169 p. – ISBN 978-1-4842-4149-3.
11. Крива Без'є. Режим доступу до ресурсу: https://ru.wikipedia.org/wiki/Кривая_Безье.
12. Гамма-корекція. Режим доступу до ресурсу: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/GammaCorrection_demo.jpg.
13. Перцептрон. Режим доступу до ресурсу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Перцептрон>.
14. Parikh Shan S., Blackwell Daniel J., Gomez-Hurtado Nieves, Frisk Michael, Wang Lili, Kim Kyungsoo, Dahl Christen P., Fiane Arnt, Tønnessen Theis, Kryshchal Dmytro O., Louch William E., and Knollmann Bjorn C.. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes / Shan S. Parikh, Daniel J. Blackwell, Nieves Gomez-Hurtado, Michael Frisk, Lili Wang, Kyungsoo Kim, Christen P. Dahl, Arnt Fiane, Theis Tønnessen, Dmytro O. Kryshchal, William E. Louch, and Bjorn C. Knollmann // Circulation Research. – 2017. – Vol. 121, №12. – P. 1323-1330.
15. База даних зображень кардіоміоцитів. Режим доступу до ресурсу: Confocal Microscopy Images of Cardiomyocyte Development Stages | IEEE DataPort (iee-dataport.org)